

Itaconsäureherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen als Ersatz für petrochemisch hergestellte Acrylsäure

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Anja Kuenz
aus Mühlhausen

1. Referent:	Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop
2. Referent:	apl. Professor Dr. Siegmund Lang
eingereicht am:	30.01.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	22.05.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin/den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

A. Kuenz, G. Comanescu, S. Lang, T. Willke, K. D. Vorlop: *Itaconsäureherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen - Prozessoptimierung*. (Poster) 10. Symposium „Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie“, Oldenburg (2007)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Itaconsäure	3
2.1.1	Einsatzmöglichkeiten der Itaconsäure	4
2.1.2	Herstellung der Itaconsäure	5
2.2	<i>Aspergillus terreus</i>	6
2.2.1	Fortpflanzung	6
2.2.2	Biotechnische Itaconsäureproduktion	6
2.2.2.1	Biosynthese, Enzyme	7
2.2.3	Wachstum und Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i>	12
2.2.3.1	Morphologie filamentöser Pilze	12
2.2.3.2	Mathematisches Wachstumsmodell	13
2.2.3.3	Literaturüberblick der Submerskultivierung von <i>Aspergillus terreus</i>	14
2.2.3.4	Reaktorsysteme	15
2.3	Produktaufarbeitung	18
2.3.1	Elektrodialyse	18
2.3.1.1	Aufbau der Elektrodialyse	19
2.3.1.2	Funktionsprinzip	20
2.3.1.3	Kennzahlen der Elektrodialyse	22
2.3.2	Flüssig/Flüssig-Extraktion	23
2.3.3	Kristallisation	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Kultivierungsbedingungen	28

3.1.1	Organismus/Stammhaltung	28
3.1.2	Medien und Kultivierungsbedingungen	29
3.1.3	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> in Schüttelkolben	30
3.1.4	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> in der 1,5 l Multifermenteranlage	31
3.1.4.1	Aufbau der Multifermenteranlage	31
3.1.4.2	Durchführung einer Kultivierung	31
3.1.5	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> im 3 l Umwurfreaktor	33
3.1.6	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> im 15 l Rührreaktor	35
3.2	Analytik	38
3.2.1	Biotrockenmassenbestimmung	38
3.2.2	High performance liquid chromatographie	39
3.2.3	pH-Wert Messung	42
3.2.4	Mikroskopie (Bildanalyse)	42
3.2.5	Bestimmung der Sporenkonzentration	43
3.2.6	Bestimmung der Ausbeute	43
3.3	Produktaufarbeitung	44
3.3.1	Elektrodialyse	44
3.3.1.1	Versuchsaufbau	44
3.3.1.2	Durchführung	44
3.3.2	Flüssig/Flüssig-Extraktion	47
3.3.2.1	Versuchsaufbau	47
3.3.2.2	Durchführung der Reaktivextraktion	48
3.3.2.3	Durchführung der Reextraktion von Itaconsäure	49
3.3.3	Kristallisation	50
3.4	Chemikalienliste	52
4	Ergebnisse und Diskussion	53
4.1	Wachstum und IA-Produktion im Schüttelkolben	53
4.1.1	Vergleich der IA produzierenden Stämme <i>Aspergillus terreus</i> NRRL 1960, 1963 und LU02b	53
4.1.2	Einfluss verschiedener Parameter auf die Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b	54
4.1.2.1	Handhabung während der Kultivierung	54

4.1.2.2	Temperaturoptimierung	57
4.1.2.3	Substratlimitierung/ Phosphatlimitierung/ Stickstofflimi- tierung	58
4.1.2.4	Einfluss der Sporenlagerung bei 4 °C auf die Aktivität des Pilzes <i>Aspergillus terreus</i> LU02b	63
4.1.3	Diskussion: Kultivierung im Schüttelkolben	64
4.2	Untersuchung der IA-Herstellung im 1,5 l Rührreaktor	66
4.2.1	Sauerstoffversorgung	67
4.2.1.1	Sauerstoffregelung	67
4.2.1.2	Sauerstoffoszillation	70
4.2.2	Diskussion: Kultivierung im 1,5 l Rührreaktor, Einfluss der Sauer- stoffregelung und -oszillation	73
4.2.3	Einfluss der Medienbestandteile	74
4.2.3.1	Calcium	74
4.2.3.2	Natrium	77
4.2.3.3	Phosphat, Ammonium, Nitrat	78
4.2.3.4	Einfluss von Eisen und Cystein	81
4.2.4	Diskussion: Kultivierung im 1,5 l Rührreaktor, Einfluss der Medien- bestandteile auf die IA-Produktion	84
4.2.5	Untersuchung zur Produktbildung	86
4.2.5.1	Nebenproduktbildung	86
4.2.5.2	Produkthemmung	94
4.3	Kultivierung in verschiedenen Reaktorformen	98
4.3.1	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> in der 1,5 l Multifermen- teranlage	98
4.3.2	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> in dem 3 l Umwurfreaktor	101
4.3.3	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> in dem 15 l Rührreaktor	103
4.3.4	Vergleich: Itaconsäureherstellung mit <i>Aspergillus terreus</i> - Ci- tronensäureherstellung mit <i>Aspergillus niger</i>	105
4.4	Vergleich der IA produzierenden Stämme <i>Aspergillus terreus</i> NRRL 1960, 1963 und LU02b in 1,5 l Rührreaktoren	106
4.5	Verdunstungseffekte	107
4.6	Preiswerter Rohstoff	108
4.6.1	Identifizierung und Analyse von Quellen	108
4.6.2	Mikrobielle Verwertbarkeit	109

4.6.2.1	Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen	109
4.6.2.2	Verwertbarkeit von Neben- bzw. Abfallprodukten	112
4.6.2.3	Diskussion: Einsatz von Alternativsubstraten sowie Neben- bzw. Abfallprodukten	114
4.7	Aufarbeitung der Itaconsäure	115
4.7.1	Elektrodialyse	115
4.7.1.1	Bestimmung der Grenzstromdichte	116
4.7.1.2	Elektrodialyse der Modelllösungen	116
4.7.1.3	Elektrodialyse des Kulturüberstandes	118
4.7.2	Flüssig/Flüssig-Extraktion	122
4.7.2.1	Optimierung des molaren Amin/Säure-Verhältnisses sowie der Amin/Alkohol-Massenverhältnisse	122
4.7.2.2	Optimierung der Temperatur und der Extraktionsdauer	124
4.7.2.3	Einsatz des Extraktionssystems bei realen Fermentations- brühen	125
4.7.2.4	Untersuchung der Reextraktion	127
4.7.2.5	Untersuchung der Verträglichkeit des Extraktionsmittels	128
4.7.3	Kristallisation	130
4.7.4	Diskussion: Einsatz der verschiedenen Aufarbeitungsmethoden	131
5	Zusammenfassung und Ausblick	134
A	Analysenwerte der Neben- bzw. Abfallprodukte	136
A.1	Analysenwerte des Kartoffelrestfruchtwasser- Konzentrates (Fa. Südzucker AG)	136
A.2	Analysenwerte des Maisquellwasser (Fa. Südzucker AG)	137
B	Danksagung	138

Abbildungsverzeichnis

2.1	Acrylsäure (a), Itaconsäure (b), Citraconsäure (c), Mesaconsäure (d)	3
2.2	Nebenfruchtform des <i>Aspergillus terreus</i> ; Konidienträger (Schlegel, 1985)	7
2.3	Biosyntheseweg der Itaconsäure (Bonnarme et al., 1995; Winskill, 1983; Jaklitsch et al., 1991)	8
2.4	Verschiedene Bauformen von Bioreaktoren und ihre Grundprinzipien	16
2.5	Modularer Aufbau des Elektrodialyse-Stapels	19
2.6	Funktionsprinzip der Elektrodialyse	20
2.7	Kationenaustauscherpolymer mit angrenzender verdünnter Lösung	21
2.8	Strukturformel Trioctylamin (TOA)	25
2.9	Bindungscharakter des (1,1)-Komplexes	25
2.10	Solvatation des Komplexes	25
2.11	Wasserlöslichkeitskurve der Itaconsäure nach Pfizer (Pfizer, 1972)	27
3.1	Reaktoraufbau und Abmessungen des 1,5 l Glasrührreaktors	32
3.2	Reaktoraufbau und Abmessungen des 3 l Umwurfreaktors (Meredos)	34
3.3	Reaktoraufbau und Abmessungen des 15 l Rührkesselreaktors (Braun, Biostat E)	36
3.4	Gravimetrische Biotrockenmassenbestimmung des filamentösen Pilzes <i>Aspergillus terreus</i>	38
3.5	Schema der HPLC-Anlage	39
3.6	Schema der Elektrodialyseanlage	44
3.7	Aufbau der Elektrodialyseanlage	45
3.8	Aufbau der Extraktionsanlage	47
3.9	Fließschema der Durchführung des Extraktionsprozesses	48
3.10	Fließschema der Kristallisation	50
4.1	Itaconsäure Produktion verschiedener <i>Aspergillus terreus</i> Stämme in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	54

4.2	Neue Handhabung (gleichmäßige Sauerstoffversorgung) im Vergleich zu 10 Minuten nicht schütteln vor jeder Probenahme (schlechte Sauerstoffversorgung); Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	55
4.3	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm a.) schlechte Sauerstoffversorgung; b.) gleichmäßige Sauerstoffversorgung	56
4.4	Variation der Kultivierungstemperatur von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 120 g/l Glucose, 0,04 g/l KH ₂ PO ₄ , Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	57
4.5	Höhere Substratanfangskonzentration von 180 g/l im Vergleich zu 120 g/l; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	59
4.6	IA-Produktion und Biomassenwachstum bei Verwendung verschiedener Phosphatkonzentrationen; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	60
4.7	IA-Produktion und Glucoseverbrauch bei verschiedenen Ammoniumnitratkonzentrationen; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	61
4.8	IA-Produktion und Ammoniumkonzentration bei verschiedenen Ammoniumnitratkonzentrationen und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	62
4.9	IA-Produktion und Nitratkonzentration bei verschiedenen Ammoniumnitratkonzentrationen; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	62
4.10	Unterschiedliche Lagerungszeit der Sporen; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	64
4.11	Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA-Konzentrationen in 250 ml Erlenmeyerkolben und 1,5 l Glasfermenter (Jahnz et al., 2003)	65
4.12	Biomassenaustrag im 1,5 l Glasfermenter der 4fach Fermenteranlage; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	68
4.13	Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung - ohne Sauerstoffregelung, Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	69
4.14	Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung - Zuluftausfall (1 h), Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	70
4.15	Zuluft der Sauerstoff-Oszillation (Begasungsrate), Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter mit Zuluftregelung (oszillierend, Periode=100 s)	71

4.16 Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Zuluftregelung (Begasungsrate ist oszillierend, Periode=100 s), Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	71
4.17 Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Zuluftregelung (oszillierend, Periode=2 h), Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	72
4.18 Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA-Konzentrationen in 1,5 l Glasfermenter unter verschiedenen Sauerstoffversorgungen, Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	73
4.19 Variation der CaCl_2 Konzentration, Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	74
4.20 Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA-Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter bei verschiedenen CaCl_2 Konzentrationen, Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	75
4.21 Übersicht der Pilzmorphologie von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b mit verschiedenen CaCl_2 Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt ; 40fach vergrößert	76
4.22 Variation der NaCl Konzentration, Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	77
4.23 Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA-Konzentrationen bei verschiedenen NaCl Konzentrationen, Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	78
4.24 Ammonium- und Nitratkonzentration der Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung (25 %), Referenz, Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	79
4.25 Phosphat- und Nitratkonzentration der Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung (25 %), Referenz, Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	79
4.26 IA-Produktion von <i>A. terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasreaktor, Standardproduktionsmedium und täglicher Zugabe von 3,35 mg/l PO_4 , 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	80
4.27 Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, Vergleich zwischen FeCl_3 und FeSO_4 , 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	82
4.28 Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, Zusatz verschiedener Cystein Konzentrationen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	83
4.29 Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, Zusatz von 0,2 g/l Cystein, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	83
4.30 Übersicht der Pilzmorphologie von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b mit verschiedenen Cystein Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt; 40fach vergrößert	84

4.31	UV-Chromatogramm (Verdünnung 1:100) einer Standardkultivierungen von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter nach 8 Tagen Kultivierungsdauer, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	88
4.32	Zeitlicher Verlauf der Nebenprodukte (Verdünnung 1:100) von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter bei der Kultivierung mit Zuluftausfall nach 1,5 Tagen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	89
4.33	Zeitlicher Verlauf der Nebenprodukte (Verdünnung 1:100) von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter bei der Kultivierung mit täglicher Phosphatzugabe, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	90
4.34	UV-Detektorsignal der cis- und trans-Aconitsäure; HPLC: Säule - BioRad HPX87H, Fluss 0,6 ml/min, T 23 °C, Laufmittel 5 mM H ₂ SO ₄	91
4.35	Cis- und trans-Aconitsäure bei verschiedenen Kultivierungen von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	92
4.36	cis-Aconitsäure Standard, zeitlicher Verlauf der cis/trans Umlagerung bei verschiedenen Temperaturen	93
4.37	Trans-Aconitsäure Standard, zeitlicher Verlauf der trans/cis Umlagerung bei 33 °C	94
4.38	Kultivierungsverlauf von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter mit Vorlage von 30 g/l Itaconsäure, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	95
4.39	Kultivierungsverlauf von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter mit Zugabe von 10 bzw. 20 g/l Itaconsäure nach 64 Stunden, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	96
4.40	Übersicht der maximalen Produktivitäten und IA-Endkonzentrationen von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b mit Vorlage von 30 g/l IA, mit Zugabe von IA in unterschiedlichen Konzentrationen nach 64 h und des Medien austauschs im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	97
4.41	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	99
4.42	Nebenprodukte der Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	100
4.43	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 3 l Umwurfreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	102
4.44	Mikroskopie der Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 3 l Umwurfreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt; 40fach vergrößert	103
4.45	Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 15 l Rührreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt; 40fach vergrößert	104
4.46	Mikroskopie der Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 15 l Rührreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt; 40fach vergrößert	105

4.47	Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, NRRL 1960, NRRL 1963 unter Standardbedingungen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	106
4.48	Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b, NRRL 1960, NRRL 1963 unter Standardbedingungen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	107
4.49	Vergleich verschiedener C-Quellen; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	109
4.50	Vergleich verschiedener C-Quellen; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b im 1,5 l Glasfermenter; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	111
4.51	Einsatz verschiedener Rohsubstrate bei einer Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	112
4.52	Zusatz verschiedener Maisquellwasserkonzentration zu dem Standardproduktionsmedium; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	113
4.53	Übersicht der maximalen Produktivität und der maximal produzierten IA-Konzentration unter Verwendung von alternativen Substraten; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben (SK) sowie 1,5 l Rührreaktor (RK); 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt	114
4.54	Übersicht der maximalen Produktivität und der maximal produzierten IA-Konzentration unter Zusatz von Neben- bzw. Abfallprodukten; Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben (SK); 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm	115
4.55	Bestimmung der Grenzstromdichte der Elektrodialyse Einheit PC Cell ED 1 mit einer Membranfläche von 58 cm ²	116
4.56	Elektrodialyse mit Modelllösungen, bestehend aus Glucose und Itaconsäure; 1l Diluat, 1l Konzentrat, 15V; Konzentrationsverlauf Itaconsäure im Diluat (geschlossene Symbole) und im Konzentrat (offene Symbole); Widerstandsverläufe .	117
4.57	Elektrodialyse eines biomassefreien Kulturüberstandes im Vergleich zu einer Modelllösung, bestehend aus Glucose und IA; 1 l Diluat, 1 l Konzentrat, 15 V, Konzentrationsverlauf von Diluat (geschlossene Symbole) und Konzentrat (offene Symbole), Widerstandsverläufe	119
4.58	Elektrodialyse eines biomassefreien Kulturüberstandes zur Aufkonzentrierung der IA im Konzentrat, 0,8 l Diluat, 0,4 l Konzentrat, 15 V	120
4.59	Chromatogramme einer Elektrodialyse im Vergleich; Null- und Endprobe des Diluates sowie die Endprobe des Konzentrates; UV-Detektor; Säule: Fermentation Monitoring BioRad; 0,8 ml/min, 25 °C; 5 mM H ₂ SO ₄	121
4.60	Optimierung des Amin/Säure-Verhältnisses bei konstantem Amin/1-Butanol-Massenverhältnis	123
4.61	Optimierung des Amin/Alkohol-Verhältnisses bei konstantem Amin/Säure-Molverhältnis	124

4.62	Reaktivextraktion mit TOA/1-Octanol (0,2 g/g), Variation der Parameter: Extraktionsdauer bei 40 °C; Temperatur bei 2 Minuten, $\nu_{M(Amin/Säure)} = 1$, $V_{wässrig} = V_{organisch}$, Modelllösung mit 61,25 g/l Itaconsäure und 19 g/l Glucose	125
4.63	HPLC-Chromatogramm (UV-Detektor) einer Fermentationsbrühe vor und nach der Reaktivextraktion, TOA/1-Octanol 0,2 g/g, $\nu_{M(Amin/Säure)} = 1$, $V_{wässrig} = V_{organisch}$ 2 Minuten Durchmischungsdauer, 25 °C	126
4.64	Rückextraktion mit wässriger Ammoniaklösung, Variation der Parameter Ammoniakkonzentration und Temperatur; 20 Minuten, $V_{wässrig} = V_{organisch}$, Extraktphasen aus Reaktivextraktionen der Modelllösung mit 61,25 g/l Itaconsäure und 19 g/l Glucose	128
4.65	IA-Produktionsverläufe der Fermentation von <i>A. terreus</i> LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben (SK), Standardproduktionsmedium mit Zugabe verschiedener Konzentrationen von 1-Butanol, 1-Octanol und Decanol; 33 °C, Start pH 3,1 ungerichtet, 120 Upm	129
4.66	Kristallisation, Versuche UK1-UK4, Abbildungen der Feststoffe	130
4.67	Kristallisation, Vergleich der Itaconsäurekonzentrationen im Feststoff, Filtrat und Verlust; Versuche UK1-4 (\equiv Säule 1-4)	131

Tabellenverzeichnis

2.1	Physikalische Eigenschaften der Itaconsäure	4
2.2	Sicherheitshinweise der Itaconsäure im Vergleich zur Acrylsäure	4
2.3	Übersicht der veröffentlichten Fermentationen zur Itaconsäureherstellung mit <i>Aspergillus terreus</i> (Okabe et al., 1993; v.Fries, 1966; Lockwood and Reeves, 1945; Nubel and Ratajak, 1962; Batti and Schweiger, 1963; Welter, 2000; Dwiarti et al., 2002; Rhone-Poulenc, 1994)	15
2.4	Gegenüberstellung Rührkessel und Umwurfreaktor (Adler and Flechter, 1983; Chmiel, 1991; Deckwer et al., 1987; Sittig and Heine, 1977)	17
2.5	Wasserlöslichkeit (w/w) organischer Lösungsmittel bei 20 °C (1-Butanol, 1-Octanol), 25 °C (1-Decanol) (Merck, 2003)	26
3.1	Standardproduktionsmedium für die Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i>	29
3.2	Geräteliste für die Kultivierung von <i>Aspergillus terreus</i> im Schüttelkolben	30
3.3	Geräteliste der verschiedenen Reaktoren	37
3.4	Geräteliste der HPLC zur Bestimmung von Zuckern und organischen Säuren	40
3.5	Geräteliste und Parameter der HPLC zur Bestimmung von Ammonium	41
3.6	Geräteliste und Parameter der HPLC zur Bestimmung von Nitrat	41
3.7	Geräteliste und Parameter der HPLC zur Bestimmung von Phosphat	42
3.8	Versuchsbezeichnung und eingesetztes Volumen der Elektrodialyse Versuche mit realer Kulturbrühe	46
3.9	Geräteliste für den Elektrodialyse Prozess	47
3.10	Geräteliste der Reaktivextraktion	50
3.11	Geräteliste der Kristallisation	51
3.12	Chemikalienliste	52
4.1	Ionenchromatographie-Massenspektroskopie des Kulturüberstandes einer Kultivierung mit <i>A. terreus</i> LU02b	87

4.2	Retentionszeiten von Itaconsäure und der gebildeten Nebenprodukte bei der Kultivierung von <i>A. terreus</i> LU02b; HPLC: Säule - BioRad HPX87H, Fluss 0,6 ml/min, T 23 °C, Laufmittel 5 mM H ₂ SO ₄	88
4.3	Kennzahlen der Elektrodialyse mit Modelllösungen bestehend aus Glucose und IA, bei 15 V (konstant)	118
4.4	Kennzahlen aller Elektrodialyse Versuche mit Kulturüberstand, bei 15 V (konstant)	120
4.5	Extraktion (TOA/1-Butanol und TOA/1-Octanol) von Itaconsäure aus biomassereinem Kulturüberstand KÜB sowie aus Kulturbrühe mit Biomasse im Vergleich zu Modelllösungen; $\nu_{M(Amin/Säure)} = 1$, $V_{wässrig} = V_{organisch}$	125
A.1	Produktdatenblatt Kartoffelrestfruchtwasser- Konzentrat 24.121 (KRFW); erstellt: 28.08.2002; Analysenwerte/Nährstoffgehalt	136
A.2	Analysenwerte/Nährstoffgehalt des Maisquellwasser, Fa. Südzucker AG	137

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Einheit	Bezeichnung
A	[m ²]	Fläche
c	[g/l]	Konzentration
c_{MO}	[ml ⁻¹]	Mikroorganismenkonzentration
E	[Ah]	Energie
ϵ	[kWh/kg]	spezifische Energie
F	[C/mol]	= 96485,3 Faraday-Konstante
h	[mm]	Kammerhöhe
i	[A/cm ²]	elektrische Stromdichte
I	Ampere [A]	elektrische Strom
t	[h]	Zeit
m	[g]	Masse
M	[g/mol]	molare Masse
μ	[h ⁻¹]	spezifische Wachstumsrate
n	[mol]	Stoffmenge
\bar{n}	-	Mittelwert der Mikroorganismenanzahl je Kleinquadrat
pO ₂	[%]	prozentualer gelöst Sauerstoffpartialdruck
P	[g/lh]	Produktivität
Q	Coulomb [C=As]	elektrische Ladungsmenge
R	ohm [Ω]	Widerstand
R ²	-	Korrelationskoeffizient
RZA	[mmol/(lh)]	Raum-Zeit-Ausbeute
T	[°C]	Temperatur
U	Volt [V]	elektrische Spannung
ν_M	[mol/mol]	Molverhältnis
ν_m	[g/g]	Massenverhältnis
v/vm	[l/(lmin)]	Begasungsrate
V	[l]	Volumen
x	[g/l]	Biomassenkonzentration
$Y_{P/S}$	[%] (mol/mol)	molare Ausbeute

Abkürzung	Bezeichnung
AAM	Anionenaustauschermembran
ADP	Adenosindiphosphat
ALR	Airliftreaktor
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BFM	Biofeuchtmasse
BGIA	Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz
BTM	Biotrockenmasse
cAD	cis Aconitat-Decarboxylase
CAS	Chemical Abstracts Service
CSL	Maisquellwasser (engl. Corn Steep Liquor)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Extraktionsmittel
ED	Elektrodialyse
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
GESTIS	Gefahrstoffinformationssystem
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IA	Itaconsäure
IRE	iron responsive elements
IRP	iron responsive proteins
k.A.	keine Angabe
KAM	Kationenaustauschermembran
KÜB	Kulturüberstand
KVG	Konversionsgrad
LD ₅₀	mittler letale Dosis
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinsureamidadenindinucleotidphosphat
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
NTG	nitrosoguanidine
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OFK	Oberflächenkultur
PEEK	Polyetheretherketon
PNC	Kartoffelrestfruchtwasser
R	Raffinat
RI	Brechungsindex (engl. refractive index)
RK	Rührreaktor
SK	Schüttelkolben
STR	Rührkesselreaktor

Abkürzung	Bezeichnung
TCC	Tricarbonsäurecyclus
TOA	Trioctylamin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolet
WGK	Wassergefährdungsklasse
X	abzutrennender Stoff

Kapitel 1

Einleitung

Spätestens seit den 80er Jahren sind in den weltweiten Nachrichten der Presse im ständigen Wechsel die ökologischen Probleme Stickstoffausstoß, Kohlendioxidausstoß und Erdölknappheit zu finden. Als Gegenmaßnahmen werden meist neue Technologien zur Reduzierung des Energiebedarfs und Verwendung alternativer Energieträger proklamiert. Alternativen zum heutigen Hauptenergieträger Erdöl sind zum einen erneuerbare Energien wie Wind- und Solarkraft und zum anderen nachwachsende Rohstoffe.

Nachwachsende Rohstoffe sind land- und forstwirtschaftliche Produkte die im Nahrungsmittelbereich Anwendung finden und in der weißen Biotechnologie, Nutzung moderner biotechnischer Methoden für industrielle Produktionsprozesse, Primärenergieträger für mikrobiologische Biosynthesen darstellen. Aufgrund von ökonomischen als auch ökologischen Gründen (Nachhaltigkeit) vergrößert sich der Anbauumfang sowie das Spektrum der Verwendungsmöglichkeiten zunehmend. Produkte aus pflanzlichen Rohstoffen sind weitgehend CO₂ neutral. Sie setzen nach ihrem Gebrauch bei der Verbrennung oder Kompostierung nur die Menge CO₂ frei, die die pflanzlichen Rohstoffe während des Wachstums der Atmosphäre entnommen haben. Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe, im Bereich der Produktherstellung in der chemischen Industrie und vor allem im Kunststoffbereich, ermöglicht den Einstieg in Kreislaufwirtschaftssysteme und damit die Entwicklung einer nachhaltigen Wirtschaftsform.

Die chemische Industrie basiert allerdings mit dem Aufkommen der Erdölindustrie bis heute nahezu ausschließlich auf der Verwendung des fossilen Energieträgers Erdöl. Die Produktsynthese der chemischen Industrie und vor allem in der Polymerchemie lässt sich aber auch mit biotechnischen Prozessen durchführen. So wird z.B. in der bulk Polymerchemie die petrochemisch hergestellte Acrylsäure eingesetzt, die sehr ähnliche Eigenschaften zeigt wie eine biotechnisch herstellbare organische Säure, die Itaconsäure. Im Vergleich zur Acrylsäure ist die Itaconsäure aber nicht gesundheitsschädlich und ungiftig. Außerdem sind aufgrund der besonderen Struktur der Itaconsäure einige Eigenschaften der resultierenden Lackharze, wie Haftung, Benetzung, usw. von Vorteil. So könnte die Itaconsäure mit einem umweltfreundlichen Herstellungsverfahren in der chemischen Industrie bisher eingesetzte umweltbelastende Verbindungen, wie die Acrylsäure, ersetzen und zudem als neue Monomerkomponente neue Anwendungsfelder erschließen.

Zur Zeit ist die biotechnische Itaconsäureproduktion durch den Pilz *Aspergillus terreus* aufgrund mangelnder Prozessstabilität, niedriger Produktkonzentration, langer Kultivierungszeiten sowie teurer Aufarbeitung gegenüber der petrochemisch hergestellten Acrylsäure nicht konkurrenzfähig.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Produktion der Itaconsäure durch den filamentös wachsenden Pilz *Aspergillus terreus* genauer zu untersuchen, zu analysieren und zu stabilisieren. Die Produktion muss effizienter und kostengünstiger werden und reproduzierbar durchführbar sein. Kenntnisse über das Wachstum, die Produkt- und Nebenproduktbildung sowie Hemmung und Limitierung von Medienbestandteilen sind notwendig und müssen erforscht werden. Weiterhin soll die mikrobielle Verwertbarkeit preiswerter, nachwachsender Rohstoffe getestet werden.

Die vielfältigen Anwendungs- und Nutzungsmöglichkeiten dieser Dicarbonsäure erfordern eine ökonomisch und wirtschaftlich effektive Methode für die Aufarbeitung. Da die Produktreinheit ein sehr wichtiges Kriterium für das Anwendungsspektrum darstellt, ist die Forschung auf dem Gebiet der Aufarbeitung von Zielprodukten aus Biosyntheseprozessen essenziell. Die Produktaufreinigung aus der Fermentationsbrühe ist ein kostenbestimmender Faktor einer biotechnischen Produktion. Daher werden in dieser Arbeit einige Aufarbeitungsmethoden (Elektrodialyse, Flüssig-Flüssig-Extraktion und Kristallisation) eingesetzt und näher untersucht. Die Ergebnisse sollen Aufschluss über erreichbare Produktreinheit, Effektivität einer Methode und Ausblicke zu weiteren Entwicklungen geben.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

Diese Arbeit wird im Verbundvorhaben *Mikrobielle Produktion von Itaconsäure* Teilverbund 1: „Itaconsäureherstellung aus nachwachsenden Rohstoffen als Ersatz für petrochemisch hergestellte Acrylsäure“ durchgeführt. Voraussetzung für die Durchführung dieser Arbeit sind Kenntnisse über die Biosynthese von Itaconsäure, über Wachstums- und Produktionsverhalten des Pilzes *Aspergillus terreus* sowie über den theoretischen Hintergrund der verschiedenen Aufarbeitungsmethoden.

2.1 Itaconsäure

Itaconsäure (IA) ist eine der viel versprechenden organischen Säuren mit der es möglich ist, petrochemische Monomere wie z.B. die Acrylsäure (Abbildung 2.1) zu ersetzen, sowie neue Anwendungsfelder zu schließen.

IA wurde bereits 1837 als Thermolyseprodukt der Citronensäure entdeckt (Baup, 1837). Sie ist eine weiße, kristalline, einfach ungesättigte Dicarbonsäure, die auch als Methylenbernsteinsäure (3-carboxy-3-butensäure) bezeichnet wird. Sie besitzt zwei Carboxylgruppen, eine konjugierte Doppelbindung sowie eine durch eine Carboxylgruppe aktivierte Äthyl-Methylengruppe (Abbildung 2.1).

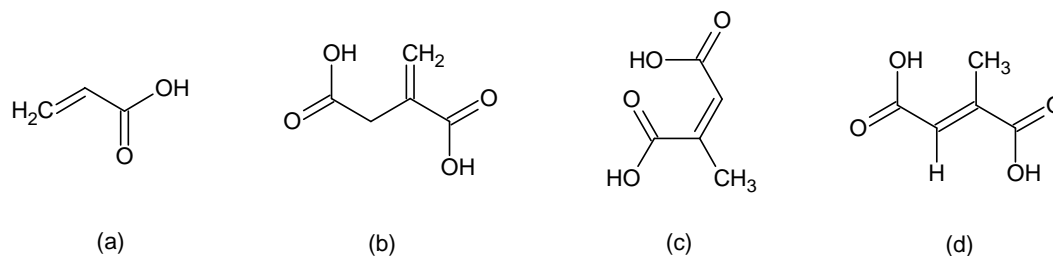


Abbildung 2.1: Acrylsäure (a), Itaconsäure (b), Citraconsäure (c), Mesaconsäure (d)

Itaconsäure ist isomer zur Citraconsäure und zur Mesaconsäure. Bei erhöhten Temperaturen und unter stark basischen Bedingungen können sich diese drei Isomere ineinander

umwandeln. Allerdings ist IA unter sauren, neutralen oder schwach basischen Bedingungen stabil (Rüdiger, 2000).

IA kristallisiert in rhombischen Doppelpyramiden und besitzt die in der Tabelle 2.1 aufgezeigten physikalische Konstanten (Pfizer, 1972; Willke and Vorlop, 2001; OECD, 2008).

Tabelle 2.1: Physikalische Eigenschaften der Itaconsäure

physikalische Erscheinung	weißes kristallines Pulver
Molekulargewicht	130,1 g/mol
Schmelzpunkt	167-168 °C
Siedepunkt	268 °C
Dichte	1,632 g/l (20 °C)
pH-Wert	2 (80 mg/l)
pK_a -Werte	3,84 und 5,55
Wasserlöslichkeit	83 g/l (20 °C)

Itaconsäure ist im Vergleich zur Acrylsäure (Tabelle 2.2) weder augen- noch schleimhautreizend und ihre orale Toxizität ist ebenfalls deutlich geringer (Rüdiger, 2000).

Tabelle 2.2: Sicherheitshinweise der Itaconsäure im Vergleich zur Acrylsäure

	Itaconsäure	Acrylsäure
CAS-Nr.	97-65-4 ^[1]	79-10-7 ^[3]
Gefahrensymbol	reizend ^[1]	entzündlich, gesundheitsschädlich, ätzend, umweltgefährlich ^[3]
R-Satz	41 ^[1]	10-20/21/22-35-50 ^[3]
S-Satz	— ^[1]	26-36/37/39-45-61 ^[3]
LD_{50}	2969 mg/kg (oral, Ratte) ^[2]	>340 mg/kg (oral, Ratte) ^[3] >290 mg/kg (dermal, Kaninchen) ^[3]
WGK	1 ^[1]	1 ^[3]
MAK	-	10 ml/m ³ bzw. 30 mg/m ³ ^[1]
^[1] Eintrag in der GESTIS-Stoffdatenbank des BGIA (GESTIS, 2008)		
^[2] OECD Datenblatt (OECD, 2008)		
^[3] (Merck, 2003)		

2.1.1 Einsatzmöglichkeiten der Itaconsäure

Die Vielfalt der funktionellen Gruppierungen im Itaconsäuremolekül machen sie zu einem wirksamen Zwischenprodukt bei der Herstellung von komplexen organischen Verbindungen. Es ergeben sich verschiedene Reaktionsmöglichkeiten:

- Salzbildung mit Metallen
- Veresterung mit Alkoholen
- Anhydridbildung
- Additionsreaktionen
- Polymerisation

Die industriell vielseitige Einsetzbarkeit von Itaconsäure und deren Reaktionsverbindungen spiegelt sich im breiten Anwendungsspektrum wieder:

- Co-Monomer: verbessert Eigenschaften von Kunststoffen (Elastomere) und hitzestabile Harze
- Co-Polymerisat: Steigerung der Haftungseigenschaften von Tinte
- Latexlackfarben, Bodenbeschichtungen, Auslegware
- Herstellung von Detergenzien und Hilfsstoffen
- Kationentauscher
- Herstellung von künstlichem Glas und bioaktiven Komponenten in der Landwirtschaft (Pflanzenschutz)

(Willke and Vorlop, 2001; Lockwood, 1975; Pfizer, 1972)

2.1.2 Herstellung der Itaconsäure

Itaconsäure ist sowohl chemisch als auch biotechnisch herstellbar:

- Eine **chemische Methode** um IA herzustellen besteht in der Pyrolyse von Citronensäure und in der Hydrolyse dieser Anhydride (Baup, 1837). Weiterhin wurde IA über die Decarboxylierung von Aconitsäure hergestellt und erhielt als Anagramm die Bezeichnung Itaconsäure. Weitere chemische Synthesen, wie Destillation von Citronensäure und Weiterbehandlung der Anhydride, Oxidation von Mesityloxide mit anschließender Isomerisierung der gebildeten Citraconensäure, oder Oxidation von Isopren sind bekannt (Willke and Vorlop, 2001).
- Zur Herstellung der Dicarbonsäure ist seit den 40er Jahren die **biotechnische Produktion**, mit den Stämmen *Aspergillus itaconicus* und *Aspergillus terreus* als exzellente Itaconsäureproduzenten, bekannt. Die Optimierung der Kultivierung hat seit den 80er Jahren an Bedeutung gewonnen.

Keine der chemischen Verfahren zur Herstellung der Itaconsäure kann mit der biotechnischen Produktion durch Pilze konkurrieren (Tate, 1981).

Itaconsäure gewinnt aufgrund der Ressourcen- und Umweltschonung vor allem als Substituent der Acryl- oder Methacrylsäure in der Kunststoffindustrie an Bedeutung. Sowohl die Herstellung von Polymeren aus Itaconsäure als auch die Produkte dieser Kunststoffe sind weder gesundheits- noch umweltschädigend.

Die weltweite IA-Produktion lag im Jahr 2000 bei ca. 10000-15000 t/Jahr (Bressler and Braun, 2000). Charles Pfizer Food Science (USA) war bis 1979 mit 6000 t/Jahr der Hauptproduzent. Im Jahr 2001 war China mit mehreren Anlagen einer der größten IA-Hersteller. Seit 2002 sind die Hauptproduzenten von Itaconsäure Cargill (USA), Qingdao Langyatai (Group) Co. (China, Qingdao) mit 4500 t/Jahr (China Chemical Report, Nov. 2002) und Shandong Kaisen Biochemical Co. (China, Rizhao) mit Kapazitäten von 5000 t/Jahr. IA kann in zwei Reinheitsgraden, dem industriellen und dem veredelten, zu ca. 4-4,3 US \$/kg IA erworben werden (Bressler and Braun, 2000; Willke and Vorlop, 2001).

2.2 *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus gehört zu der Gruppe der Ascomyceten (Schlauchpilze). Sie zählen zusammen mit den Basidiomyceten zu den höheren Pilzen (Eumyceten) und werden innerhalb der Plectomyceten (Kleistothenzienpilze) durch seinen Gattungsnamen als Gießkannenschimmel ausgewiesen, für welche ein septiertes Myzel sowie die Bildung von Konidiosporen charakteristisch sind. Der Begriff Ascomyceten wird von dem Ascus, ein die Gruppe kennzeichnendes schlauchartiges Gebilde, hergeleitet (Schlegel, 1985).

2.2.1 Fortpflanzung

Die Gattung *Aspergillus* gehört zu den Plectomyceten und wird durch ihre Konidienstadien charakterisiert.

Der Pilz breitet sich vegetativ durch die Ausbildung langer, vielkerniger Zellfäden (Hyphen) aus, welche sich vielfach zu einem Geflecht (Myzel) verzweigen. Die Fortpflanzung erfolgt asexuell durch Konidienbildung (Sporen von Schlauchpilzen, Abbildung 2.2). Diese Konidienträger entstehen einzeln auf den Hyphen, indem sich eine Hyphenzelle, die Fußzelle, verzweigt und eine senkrechte Hyphe ausbildet, welche in einer Blase endet, aus deren Oberfläche die Sterigmen heraus wachsen. An diesen Sterigmen entstehen perlschnurförmig hintereinander angeordnete Konidien. Diese sind gefärbt und geben der Pilzkolonie die typische Färbung (Schlegel, 1985).

2.2.2 Biotechnische Itaconsäureproduktion

Kinoshita berichtet 1932 erstmals von der IA-Produktion durch Pilze (Kinoshita, 1932) und benannte diesen Organismus *Aspergillus itaconicus*. Wenige Jahre später (1939) wurden weitere Stämme des Pilzes *Aspergillus terreus* entdeckt, die besseres Wachstum zeig-

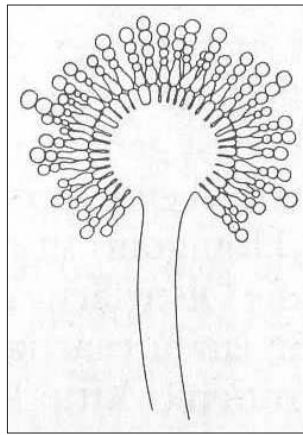


Abbildung 2.2: Nebenfruchtform des *Aspergillus terreus*; Konidienträger (Schlegel, 1985)

ten und höherer Erträge der Itaconsäure erzielen, wenn sie als Oberflächenkulturen auf Czapek-Dox Medium wuchsen (Calam, 1939). Eine systematische Studie der „Northern Regional Research Laboratory“ (NRRL) der USA (in Peoria, Illinois) in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts zeigte, dass nur eine limitierte Anzahl der *A. terreus* Stämme in der Lage waren IA zu produzieren. Der Stamm NRRL 1960 (= ATCC 10020) wurde für intensive Studien weiter verwendet (Roehr et al., 1992). Diese vorliegende Arbeit baut auf Vorarbeiten der FAL (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig) mit dem Stamm *A. terreus* NRRL 1963 sowie einem Eigenisolat *A. terreus* LU02b auf (Welter, 2000; Jahnz et al., 2003).

2.2.2.1 Biosynthese, Enzyme

Bei dem Abbau von Fetten, Kohlenhydraten und Aminosäuren entsteht das Zwischenprodukt Acetyl-CoA, welches in den Citratzyklus eintritt (Karlson et al., 1994). Itaconsäure ist ein indirektes Produkt des Citratzyklus und wird aus cis-Aconitsäure, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus gebildet (Kinoshita, 1932). Daher wird in den folgenden Abschnitten der Citratzyklus, die wesentlichen Enzyme sowie der Hauptbiosyntheseweg der Itaconsäure genauer beschrieben.

- **Citratzyklus** (auch bezeichnet als Zitratzyklus, Zitronensäurezyklus, Tricarbonsäurecyclus, Krebs-Zyklus)

Der Citratzyklus (Abbildung 2.3, Tricarbonsäurecyclus (TCC)) ist ein zentraler Kreislauf biochemischer Reaktionen im Stoffwechsel aerober Zellen. Bei Eucaryoten läuft er in den Mitochondrien ab und dient hauptsächlich dazu, organische Stoffe oxidativ abzubauen.

Das Acetyl-CoA tritt in den Citratzyklus ein und wird unter Freisetzung von Kohlendioxid und Wasser zur Gewinnung von Energie (GTP) sowie Reduktionsäquivalenten ($\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2) genutzt. Der Citratzyklus ist eng mit der Atmungskette gekoppelt und die Coenzyme ($\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2) werden dort wieder oxidiert. Durch diese Oxidation mit Sauerstoff unter Bildung von Wasser wird Energie frei,

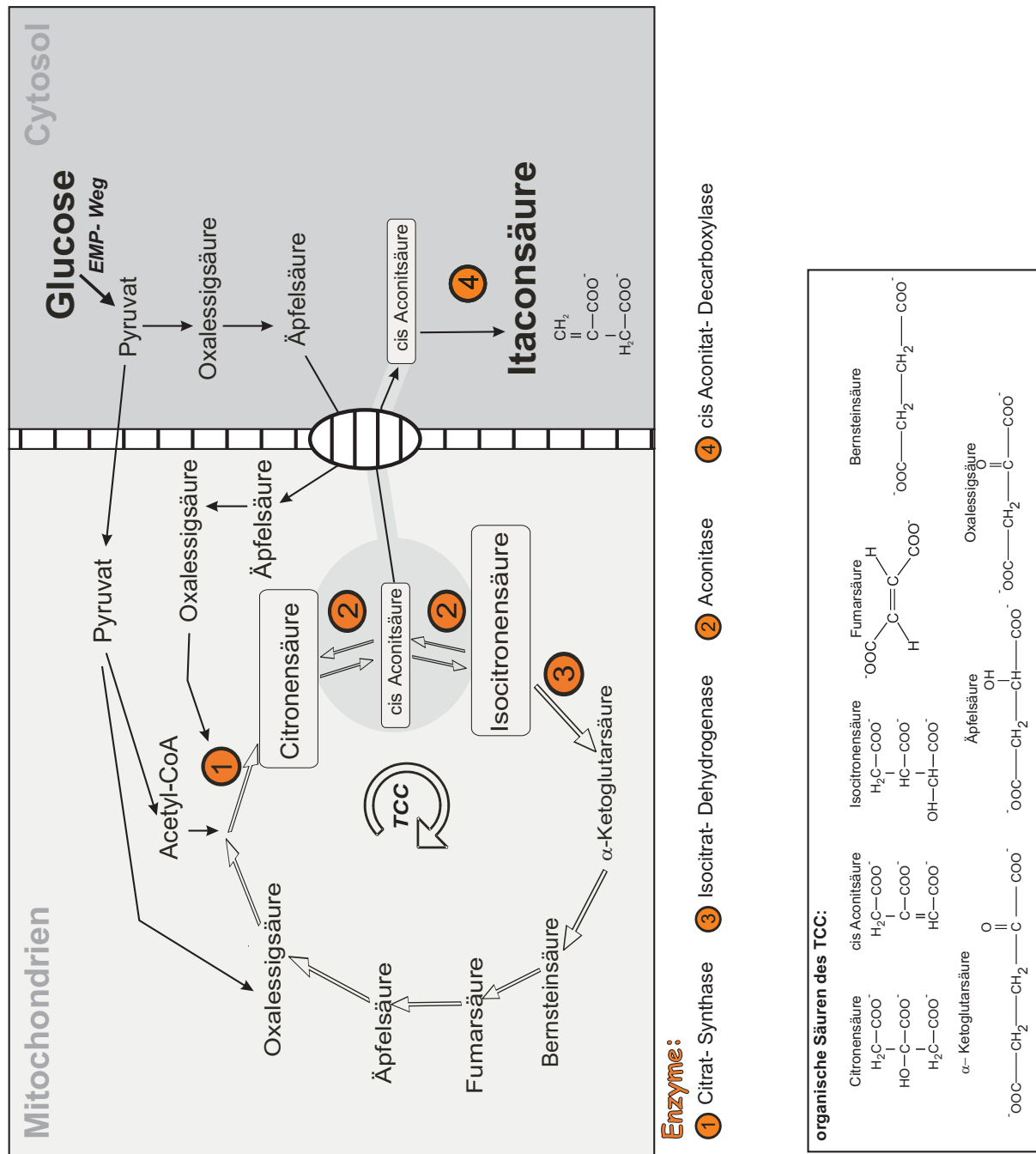


Abbildung 2.3: Biosyntheseweg der Itaconsäure (Bonnarme et al., 1995; Winskill, 1983; Jaklitsch et al., 1991)

die hauptsächlich zum Aufbau von ATP verwendet wird. Die Regulierung des Citratzyklus geschieht durch die Regulation der Enzymaktivitäten, wobei ADP/ATP, NAD^+/NADH und Ca^{2+} als Effektoren dienen. Besondere Bedeutung haben dabei die Isocitrat-Dehydrogenase, die ADP als allosterischen Aktivator benötigt und durch ATP und NADH gehemmt wird, sowie die Citrat-Synthase, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit infolge von NADH erniedrigt wird.

Bei Sauerstoffmangel wird weniger NADH verbraucht und dessen Konzentration steigt an, wodurch die Isocitrat Dehydrogenase und die Citrat Synthase gehemmt werden und der Citratzyklus zum Erliegen kommt (Karlson et al., 1994).

• Enzyme

Stoffwechselsysteme sind nur durch die Anwesenheit, bzw. Wirkung von Enzymen möglich. Enzyme beschleunigen chemische Reaktionen, indem sie deren Aktivierungsenergie herab setzen. Die Ausgangsstoffe (Edukte) einer Enzymreaktion heißen Substrate. Sie werden im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden und es bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex. Das Substrat wird in die Reaktionsprodukte umgewandelt und anschließend aus dem Komplex freigesetzt.

Nach der Reaktion liegt das Enzym, wie andere Katalysatoren, wieder in seiner Ausgangsform vor. Enzyme besitzen eine hohe Substrat- und Wirkungsspezifität. Sie binden ausschließlich die passenden Substrate („Schlüssel-Schloss-Prinzip“) und katalysieren genau eine von vielen denkbaren Reaktionen (Karlson et al., 1994).

Im folgenden werden die an der IA-Produktion beteiligten Enzyme des TCC sowie die cis Aconitat-Decarboxylase genauer beschrieben:

– Citrat-Synthase (EC 4.1.3.7)

Die Citrat-Synthase katalysiert den ersten Schritt im Citratzyklus. Das Acetyl-CoA wird mit Oxalessigsäure zu Citronensäure umgesetzt. Diese Reaktion ist praktisch irreversibel, da nach der Aldol-Addition die energiereiche Thioester-Bindung hydrolysiert wird.

Die Oxalessigsäure wird zur Initialzündung benötigt und stammt entweder aus dem Aminosäure-Stoffwechsel oder aus dem Pyruvat. Somit ist vom Kohlenhydratstoffwechsel ein direkter Zugang zur Oxalessigsäure möglich (Karlson et al., 1994). Die Oxalessigsäure wird je nach Energieladung der Zelle dem Citratzyklus entzogen und zu Biosynthesen benutzt. Ist die Energieladung der Zelle niedrig, wird die Säure dem TCC und somit der Atmungskette zugeführt.

– Aconitase (EC 4.2.1.3)

Das Enzym Aconitase (Aconitat-Hydratase, citrat (isocitrat)-Hydrolyase) katalysiert im TCC die Gleichgewichtseinstellung zwischen Citronensäure (90 %), cis-Aconitsäure (4 %) und Isocitronensäure (6 %). Diese Reaktion verläuft streng stereospezifisch (Karlson et al., 1994).

Die Aktivität der Aconitase sinkt bei seiner Lagerung und kann durch Zugabe von Eisen Ionen und einem „reducing agent“ stabilisiert bzw. reaktiviert werden. Das Enzym benötigt Eisen als Cofaktor. Andere Metalle, wie Calcium, Magnesium, Barium, Mangan, Cobalt, Nickel, Kupfer u.a. zeigten keine signifikante Reaktivierung der Enzymaktivität. Es wird angenommen, dass Eisen

an der Interaktion des Enzyms und Substrates mittels eines Substrat-Eisen-Aconitase-Komplex beteiligt ist. Untersuchungen des „reducing agent“ zeigten, dass Cystein die Aconitase nicht allein aktivieren kann, dass aber Cystein und Eisen die Aktivität stark steigern. Vermutlich wird ein Eisen Ion und ein Molekül des „reducing agent“ mit der Aconitase kombiniert (Glusker, 1971). Primär ist die Aufgabe des „reducing agent“ das Eisen reduziert zu halten, da Eisen in der reduzierten Form vorliegen muss, um enzymatisch wirksam zu sein (Bruchmann, 1963). Komponenten, die Eisen komplexieren inhibieren die Aconitase. Weiterhin ist die trans-Aconitsäure ein kompetitiver Hemmer der Aconitase (Glusker, 1971).

Die Aconitase von Hefen ist ein Isoenzym, welches sich auf zwei verschiedene subzelluläre Kompartimente aufteilt und an zwei verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt ist:

1. Die **mitochondriale Aconitase (m-Aconitase)** des TCCs setzt Citronensäure zu Isocitronensäure um und gehört zu der Familie der Eisen/Schwefel enthaltenden Proteine. Im aktiven Zentrum befindet sich ein [4Fe-4S] Cluster. Zusammen mit den Seitenketten polarer Aminosäuren, hauptsächlich Arginin-Reste, bindet es das Substrat.
2. Die **cytosolische Aconitase (c-Aconitase)**, von der angenommen wird, dass sie in Hefezellen ein Teil des Glyoxylat Zyklus¹ sowie ein Eisen regulierendes RNA bindendes Protein ist (Regev-Rudzki et al., 2005).

Die mögliche „Giftigkeit“ von Eisen erfordert eine genaue Kontrolle des Eisengehaltes in der Zelle. Eisen regulierende Proteine (IRP1 und IRP2) binden an konservierten Sequenzen („iron responsive elements“ IREs) der mRNA, die Proteine codieren, welche an der Eisenlagerung, Transport und Intermediärstoffwechsel beteiligt sind (Brown et al., 2002). Untersuchungen des Aminosäureaufbaus der c- und m-Aconitase mit der von IRPs zeigten, dass sie sich eindeutig von der m-Aconitase unterscheiden, aber mit der c-Aconitase übereinstimmen (Kennedy et al., 1992). Die Eisen regulierenden Enzyme werden aufgrund von Veränderungen des zellulären Eisenstatus reguliert. Bei hohen intrazellulären Eisenkonzentrationen wird IRP2 degradiert. IRP1 hingegen bildet ein [4Fe-4S] Cluster, die Funktion der IRE-Bindung geht verloren und die cytoplasmatische Form der Aconitase wird ausgebildet. Da die Funktion der IRE Bindung verloren geht, sinkt die Transferrin Produktion² und der Eisentransport in die Zellen sinkt. Wird nun ein bestimmtes intrazelluläres Eisenlevel unterschritten, wird das [4Fe-4S] Cluster der c-Aconitase auseinander gebaut. Damit verliert die c-Aconitase ihre Funktion und stellt die IRE bindende Aktivität wieder her (Brown et al., 2002).

Weder die cytosolische noch die mitochondriale Aconitase kann die Aufgabe der jeweils anderen übernehmen (Regev-Rudzki et al., 2005).

¹Durch den Glyoxylat Stoffwechsel können Pflanzen und Pilze organische Substanzen mit 4 Kohlenstoff Atomen aus Komponenten mit 2 Kohlenstoffatomen herstellen. Dieses ermöglicht ihnen das Wachstum auf Acetat, Ethanol oder Oleaten als Kohlenstoffquelle (Regev-Rudzki et al., 2005).

²Transferrin ist ein Transportprotein, das für die Eisenversorgung der Zellen verantwortlich ist.

– **cis Aconitat-Decarboxylase (EC 4.1.1.6)**

Die cis Aconitat-Decarboxylase (cAD) ist kein Enzym des Citratzyklus. Es wird während der IA-Produktionsphase im Cytosol der IA produzierenden Pilze *Aspergillus terreus* nachgewiesen und setzt cis-Aconitsäure (Zwischenprodukt des TCC) durch eine Decarboxylierung zu Itaconsäure um.

Das Enzym cAD synthetisiert den größten Anteil der Itaconsäure durch Decarboxylierung der cis-Aconitsäure und zu einem sehr geringen Anteil aus d-Isocitronensäure und Citronensäure. Das pH Optimum liegt bei 5,6 und das Maximum bei 6,0. Die Notwendigkeit von Cofaktoren für die cAD konnte nicht nachgewiesen werden (Bentley and Thiessen, 1957). Jedoch wird das Enzym durch Schwermetalle, wie *p*-Chloromercuribenzoate, Zn^{+} , Cu^{+} , Hg^{+} , gehemmt. Kein Einfluss auf die Aktivität hatten EDTA, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} u.a. (Dwiarti et al., 2002).

– **Isocitrat Dehydrogenase (EC 1.1.1.41/42)**

Die Isocitrat Dehydrogenase ist ein Bestandteil des Citronensäurezyklus. Es gehört zur Klasse der Oxidoreduktasen. Es ist ein NAD^{+} bzw. $NADP^{+}$ abhängiges Enzym welches die Oxidation von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat (α Ketoglutaratsäure) und CO_2 katalysiert (Karlson et al., 1994). Bei der IA-Produktion durch den Pilz *A. terreus* konnte nur die $NADP^{+}$ abhängige Form der Isocitrat Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.42) nachgewiesen werden, welches zur Aktivierung Mg^{2+} oder Mn^{2+} benötigt, wobei Mn^{2+} den besseren Cofaktor darstellt (Winskill, 1983).

Dieses mitochondriale Enzym überträgt den Wasserstoff auf $NADP^{+}$ und katalysiert parallel die Decarboxylierung des Zwischenproduktes Oxalsuccinat zu dem Produkt 2-Oxoglutarat und wird von ADP, ATP und NADH allosterisch reguliert (Karlson et al., 1994).

• **Hauptbiosynthesweg der Itaconsäure Produktion**

Mittels radioaktiver Markierung von Kohlenstoffatomen (^{13}C -; ^{14}C - Radiomarkierung) und Analyse der Metabolite durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) an freien *Aspergillus*-Zellen wurde der Biosyntheseweg von Kinoshita als Hauptbiosyntheseweg der IA-Produktion (Abbildung 2.3) bewiesen (Bonnarme et al., 1995). Glucose wird glycosidisch über den Emden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Stoffwechselweg zu Pyruvat abgebaut. Das Pyruvat wird in den Citratzyklus eingebracht und zu Citronensäure synthetisiert. Das Enzym Aconitase setzt in einer Gleichgewichtsreaktion die Citronensäure zu dem Zwischenprodukt cis-Aconitsäure und in einer weiteren Reaktion zu Isocitronensäure um. Ein zweites Enzym, die cis Aconitat-Decarboxylase (cAD), bildet aus dem Zwischenprodukt cis-Aconitsäure das Produkt Itaconsäure.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten des Tricarbonsäurezyklus von isolierten Mitochondrien aus *Aspergillus terreus* trug gleichermaßen zur Bestätigung dieses Hauptbiosyntheseweges bei (Winskill, 1983).

Die Enzymaktivitäten während der Wachstums- und Produktionsphase wurden sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien bestimmt. Die Citrat-Synthase und

Aconitase sind während der Wachstums- und während der Produktionsphase aktiv. Die cAD konnte nur während der Produktionsphase und ausschließlich im Cytosol nachgewiesen werden. Da die cAD aus der cis-Aconitsäure, die in den Mitochondrien vorhanden ist, das Produkt IA synthetisiert, muss die cis-Aconitsäure aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert werden. Für den Transport durch die mitochondriale Membran wird ein Äpfelsäure/Citronensäure Antiport postuliert. Eine weitere Idee zum Transport durch die mitochondriale Membran ist, dass ein unausgeglichenes Nährstoffverhältniss zu einem Carrier System führt. Dieses Carrier System müsste selektiv für die cis-Aconitsäure sein, so dass diese Säure aus den Mitochondrien ins Cytosol transportiert wird (Jaklitsch et al., 1991).

2.2.3 Wachstum und Kultivierung von *Aspergillus terreus*

Im folgenden Kapitel wird das Wachstumsmodell filamentöser Pilze, die verschiedenen Morphologieformen, ein Überblick der Literatur über die Kultivierung von *Aspergillus terreus* sowie die Grundlagen der Kultivierung in verschiedenen Reaktorformen beschrieben.

2.2.3.1 Morphologie filamentöser Pilze

In Submerskultur reicht die Wachstumsform filamentöser Pilze von locker verteilten Zellfäden bis hin zu dicht verwobener Myzelmasse oder Pellets, bei denen die Hyphen locker oder sehr eng in ellipsoider Form aggregiert sind. In welcher Wachstumsform der Pilz auftritt, hängt nicht zuletzt von der Erbmasse ab, sondern von den chemischen und physikalischen Parametern der Kultivierung (Papagianni, 2004).

Die Morphologie filamentöser Pilze beeinflusst die Viskosität der Fermentationsbrühe, den Stofftransport und damit die Leistung des Bioreaktors.

- Wachstum in Form von **Pellets** resultiert in einer niedrigen Viskosität der Fermentationsbrühe, was sich positiv auf den Stoff- und Wärmeübergang auswirkt. Eine mikroskopische Betrachtung der Pellets zeigt, dass es im Inneren verschiedene Packungsdichten der Hyphen gibt. Überschreiten dichte Pellets³ eine bestimmte Größe, wird das Pelletinnere nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Das Wachstum wird aufgrund der eingeschränkten Diffusion der Stoffe zum Pelletzentrum hin beeinträchtigt. Bei lockeren Pellets⁴ werden die gesamten Hyphen hingegen gut mit Substrat und Sauerstoff versorgt. Exponentielles Wachstum aller Hyphen wird erreicht, aber aufgrund des eher filamentösen Wachstums steigt die Viskosität der Fermentationsbrühe.
- **Filamentöses Wachstum** resultiert in hoch viskosen Fermentationsbrühen, mit nicht Newtonschem, pseudoplastischem Verhalten. Dies hat vor allem einen negati-

³Das Pellet besteht aus sehr dicht gepackten Hyphen.

⁴Das Pellet besteht aus lockeren, offenen mehr filamentösen Myzel.

ven Einfluss auf den Übergang von der Gas- in die Flüssigphase. Bei filamentösem Wachstum ist ein höherer Leistungseintrag notwendig vergleichend zum Pelletwachstum um adequate Durchmischung und Sauerstoffübergang zu erreichen (Papagianni, 2004).

Wachstum in Form von freiem Myzel, bei einer Batch Kultivierung mit ausreichender Substratversorgung, zeigt eine homogene Verteilung der Biomasse, der Substrate und der Produkte, sowie exponentielles Wachstum mit einer konstanten spezifischen Rate (El-Enshasy, 1998).

Die Morphologie von *Aspergillus terreus* NRRL 1960 wird entscheidend durch die Anwesenheit von Calcium, Zink und Eisen beeinflusst. Die höchste Produktionsrate und IA-Ausbeute wurde mit sehr lockeren, ausgefransten Pellets mit einem Durchmesser von 0,1-0,5 mm erzielt. Bei kompakten Pellets mit dem gleichen Durchmesser sank die Produktionsrate (Gyamerah, 1995a).

2.2.3.2 Mathematisches Wachstumsmodell

Das Zellwachstum kann durch mathematische Modelle beschrieben werden. Die Gleichungen sind oft empirisch und basieren auf experimentellen Daten. Das Wachstum einzelliger Kulturen kann relativ einfach aus der Verdopplung der Zellen bei einer bestimmten Teilungsrates berechnet werden. Zur Beschreibung der Morphologie bei Pilzen sind hingegen verschiedene Ansätze notwendig. Bei der batch-Kultivierung filamentöser Pilze kann die Biomassenzunahme analog zum Wachstum einzelliger Mikroorganismen in vier Phasen eingeteilt werden.

1. lag-Phase:

Werden Kulturen mit Sporen beimpft, keimen diese in der lag-Phase aus und bilden erste Keimschläuche. Die Keimung der Sporen setzt eine physiologische Adaption wie die Synthese von Enzymsystemen voraus und hängt von der Erbmasse des Pilzes und von den Fermentationskonditionen, sowohl den physikalischen als auch den chemischen, ab. Im großen Maßstab kann das Beimpfen der Kultivierungen mit Sporen, aufgrund der Mengen die produziert werden müssen, Probleme mit sich bringen (Cocker and Greenshields, 1977).

2. Wachstumsphase:

Unter der Annahme, dass der Pilz als freies Myzel vorliegt, die Biomasse, das Substrat und das Produkt gleichmäßig verteilt sind, tritt exponentielles Wachstum ein. Die Zunahme der Biomassenkonzentration wird durch folgende Gleichung beschrieben :

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2.1)$$

mit:

x	Biomassenkonzentration
t	Zeit
μ	spezifische Wachstumsrate

Liegt ein unlimitiertes Wachstum vor und ist die Wachstumsrate (Gleichung 2.1) maximal und konstant, kann die Gleichung integriert und nach μ_{max} aufgelöst werden:

$$\mu_{max} = \frac{\ln \frac{x_{t_2}}{x_{t_1}}}{t_2 - t_1} \quad (2.2)$$

mit:

x_{t_2}	Biomassenkonzentration zur Zeit t_2
x_{t_1}	Biomassenkonzentration zur Zeit t_1
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate

Nach der Ausbildung von Pellets kann nicht mehr von einer homogenen Verteilung der Substrate um alle Hyphen ausgegangen werden. Das Wachstum von Pellets kann durch das Kubikwurzel-Gesetz angenähert werden (El-Enshasy, 1998).

3. Stationär-Phase:

Infolge der Limitierung nötiger Nährstoffkomponenten, der Einstellung eines ungünstigen pH-Wertes oder durch Akkumulation hemmender Produkte sinkt die Wachstumsrate. Das Wachstum geht in eine stationäre Phase über. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Wachstum und Absterben von Myzel, so dass die Biomassenkonzentration relativ konstant bleibt (Papagianni, 2004).

Bei der Kultivierung von *A. terreus* wird das Wachstum durch die Phosphatkonzentration im Medium limitiert. Der Pilz geht beim Unterschreiten von 0,8 mg/l Phosphat in die stationäre Wachstumsphase über und beginnt mit der Produktion von Itaconsäure (Welter, 2000).

4. Absterbe-Phase:

Die Bedingungen für das Wachstum werden aufgrund von Limitierungen der Medienkomponenten und Anreicherungen wachstumshemmender Stoffe ungünstiger und die Biomasse beginnt abzusterben. Die Absterbephase wird durch den Rückgang der Biomasse charakterisiert, da die Rate an lysierenden Zellen das Wachstum übersteigt (Prosser, 1994).

2.2.3.3 Literaturüberblick der Submerskultivierung von *Aspergillus terreus*

Während der letzten 65 Jahre Forschung zur IA-Produktion durch den Pilz *A. terreus* wurden verschiedene Einflussparameter auf das Wachstum sowie auf die Itaconsäure Ausbeute quantifiziert (Gyamerah, 1995a,b; Nubel and Ratajak, 1962; Batti and Schweiger, 1963).

Tabelle 2.3 stellt einen Überblick der wichtigsten Verfahren der letzten 65 Jahre Forschung zur IA-Produktion mittels *A. terreus* dar. Gegenübergestellt werden verschiedene

Prozessparameter wie die Art des Inoculum, der pH-Wert, die Temperatur, die Endproduktkonzentration und die eingesetzten Reaktorsysteme.

Diese Arbeiten unterschieden sich zum Teil deutlich in ihren Bedingungen. Temperaturen zwischen 30-40 °C, verschiedene Animpfmethoden mittels Sporen oder Biomasse aus Vorkulturen, definierte Minimalmedium (Batti and Schweiger, 1963; Welter, 2000) oder Komplexmedien (mit Rübenmelasse (v.Fries, 1966), Maisquellwasser (Okabe et al., 1993; Lockwood and Reeves, 1945)) fanden Anwendung. Bei den batch-Kultivierungen liegen die erreichten IA-Endkonzentrationen zwischen 50 und 90 g/l. Eine IA-Endkonzentration von 87 g/l konnte durch ein Fed-batch-Betrieb von v.Fries erzielt werden (v.Fries, 1966). Aus der Literatur geht keine einheitliche optimale Prozessführung zur IA-Produktion hervor, was einen weiteren Forschungsbedarf auf diesem Gebiet impliziert.

Tabelle 2.3: Übersicht der veröffentlichten Fermentationen zur Itaconsäureherstellung mit *Aspergillus terreus* (Okabe et al., 1993; v.Fries, 1966; Lockwood and Reeves, 1945; Nubel and Ratajak, 1962; Batti and Schweiger, 1963; Welter, 2000; Dwiarti et al., 2002; Rhone-Poulenc, 1994)

Autor	Stamm	Reaktortyp	T [°C]	c_{IA} [g/l]	P [g/(lh)]	Dauer [d]
Lockwood	NRRL 1960	OFK	30	68	0,24	12
Nubel	NRRL 1960	STR	40	70,8	0,98	3
Batti	NRRL 1960	STR	34	89,5	0,48	7,7
Okabe	IFO6365	ALR	40	63	0,66	4
Welter	NRRL 1963	SK	37	49	0,4	8
v Fries	NRRL 1960	STR	34	86,9	0,66	5,5
Dwiarti	TN484-M1	SK	30	80	0,56	6
Rhone-Poulenc	NRRL 1960	SK	34	69,7	0,44	6,7

2.2.3.4 Reaktorsysteme

Nach der Konzeptionierung aller notwendigen Medienbestandteile steht die Kultivierung im Bioreaktor im Mittelpunkt eines biotechnischen Prozesses. Bis heute wurde eine Vielzahl an Reaktorbauformen entwickelt, die meist sehr spezifisch auf die entsprechenden Bedingungen einer Kultivierung ausgelegt sind und folgende Anforderungen erfüllen (Chmiel, 1991):

- Steriler Betrieb
- Effiziente Wärmeübertragung
- Schnelle und homogene Durchmischung des Reaktorinhalts: Verteilung der Medienbestandteile, Dispersion der Gasphase, Vermeidung von Temperatur- und pH- Gradienten
- Möglichst geringer Leistungseintrag

- Eignung für stark schäumende Medien
- Vermeidung von Wandwachstum
- Nutzerfreundlichkeit, Flexibilität der Prozessführung

Die verschiedenen Bauarten (Abbildung 2.4) unterscheiden sich durch die Art des Energieeintrages, der Gasverteilung sowie der Art der Strömungsführung.

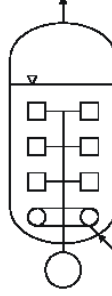
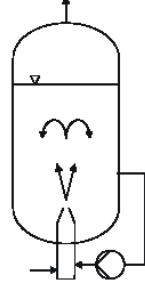

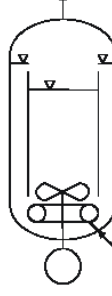
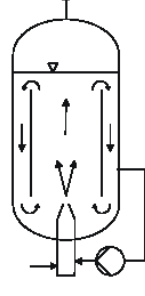

Energieeintrag & Gasverteilung	mechanisch bewegte Einbauten	äußerer Pumpenkreislauf	Gaskompression
Strömungsführung			
ohne definierte Umwälzung	 Rührkesselreaktor	 Freistrahlsreaktor	 Blasensäulenreaktor
mit definierter Umwälzung	 Umwurfreaktor	 Strahl-Schlaufenreaktor	 Airlift-Schlaufenreaktor

Abbildung 2.4: Verschiedene Bauformen von Bioreaktoren und ihre Grundprinzipien

Durch die Kultivierung myzelbildender Pilze erhöht sich aufgrund des filamentösen Es kann zu verstärktem Wandbewuchs, Bewuchs an Einbauten sowie der Zerstörung des Myzels durch zu hohe Scherbeanspruchung kommen. Bei einer Submerskultivierung filamentöser Pilze ist eine homogene, gut durchmischte Zellsuspension nicht trivial. Eine schlechte Durchmischung kann eine mangelnde Sauerstoffversorgung, lokale Nährstofflimitierungen sowie eine ungenaue Temperaturregelung zur Folge haben. Daraus resultiert ein hoher Zellstress, der zur Degeneration des Pilzes führen kann (Gibbs et al., 2000). Der Rührreaktor findet aufgrund seiner universellen Einsetzbarkeit Anwendung in zahlreichen Prozessen sowohl im industriellen als auch im Labormaßstab (Chmiel, 1991).

Der Umwurfreaktor eignet sich besonders bei stark schaubildenden Fermentationen. Durch die Strömungsführung und durch die Trombenbildung des Propellerrührers soll der Schaum mitgerissen und zerstört werden (Deckwer et al., 1987). Da diese Reaktorbauform eine gute Durchmischung, auch im Randbereich, und einen hohen Sauerstoffeintrag besitzt wird in dieser Arbeit die Kultivierung des filamentös wachsenden Pilzes *A. terreus* vergleichend im Rührreaktor und im Umwurfreaktor durchgeführt (Abbildung 2.4). Die Vor- und Nachteile dieser beiden Reaktorbauformen werden in der Tabelle 2.4 gegenüber gestellt.

Tabelle 2.4: Gegenüberstellung Rührkessel und Umwurfreaktor (Adler and Flechter, 1983; Chmiel, 1991; Deckwer et al., 1987; Sittig and Heine, 1977)

	Rührkesselreaktor	Umwurfreaktor
Strömungsprofil	radial gefördert durch Scheibenrührer	Schlaufenströmung um ein Leitrohr
+	<ul style="list-style-type: none"> • universell & flexibel einsetzbar • unempfindlich gegen Änderung der Betriebsdaten • für hohe Zähigkeiten geeignet 	<ul style="list-style-type: none"> • gute Durchmischung auch im Randbereich • hoher Sauerstoffeintrag • Schaumzerstörung • wenig Wandwachstum
–	<ul style="list-style-type: none"> • schlechte Energieausnutzung • Mischungsinhomogenitäten möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • empfindlich gegenüber vom Auslegungspunkt abweichenden Betriebswerten • eher für geringe Zähigkeiten geeignet

Für eine industrielle Anwendung ist eine Übertragung des Verfahrens („scale up“) aus dem Labormaßstab (Schüttelkolben-100 l) über die Technikumsgröße (100-1000 l) in den Betriebsmaßstab ($>1 \text{ m}^3$) notwendig (Crueger and Crueger, 1989). Das „scale up“ ist problematisch, da durch die geometrische Vergrößerung viele Einflussgrößen und Betriebsparameter mit unterschiedlicher Ausprägung verändert werden. Für eine erfolgreiche Maßstabsübertragung ist eine geometrische Ähnlichkeit der Reaktoren vorteilhaft (Storhas, 2003). Wird bereits im Labor mit Reaktoren normierter Bauart gearbeitet, erleichtert dies die Übertragung der Fermentation in industrielle Größenordnungen.

In dieser Arbeit soll das Wachstum, die Morphologie und vor allem die Itaconsäureproduktion des filamentösen Pilzes *A. terreus* ausgehend von den Kultivierungen im 1 l Maßstab⁵ in einen 15 l Rührkesselreaktor der Firma Braun⁶ untersucht werden.

⁵Die grundlegenden Untersuchungen zur Medien- und Prozessoptimierung werden auf einem Fermenterstand mit vier identischen maßangefertigten 1 l Glas-Rührreaktoren (Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden-Lenglern) durchgeführt.

⁶Die Abmessungen und Einbauten des Braun Fermenters entsprechen der Dechema-Norm.

2.3 Produktaufarbeitung

Die Qualität und die Umweltverträglichkeit der Produktaufarbeitung und Produktisolierung trägt maßgeblich zur Beurteilung eines biotechnischen Verfahrens bei. Folgende Methoden finden bei der Aufarbeitung von Itaconsäure Anwendung:

- Kontinuierlich oder am Ende einer batch-Kultivierung wird die Biomasse sowie feste Schwebstoffe durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt. Anschließend kann die Itaconsäure über mehrere Eindampf- und Kühlprozesse auskristallisiert werden, wodurch ein industrieller Reinheitsgrad der IA erreicht wird. Setzt man bei Eindampfprozessen Aktivkohle und Filtrationen ein, erhält man hochwertige IA. Die Restlösung wird durch Flüssig/Flüssig-Extraktion oder Anionenaustausch nachbehandelt (Lockwood, 1975).
- Wird bei der Fermentation Glucose oder Saccharose als Substrat eingesetzt, kann durch Kristallisation ein sauberes Produkt gewonnen werden. Das Ausfällen unlöslicher IA Salze ist möglich (Kobayashi, 1971).
- Um die Kosten der Aufarbeitung zu senken werden Technologien wie die Ultrafiltration zur Myzelabtrennung, bipolare Elektrodialyse (Kobayashi et al., 1972), Umkehrosmose oder Ionenaustauschverfahren eingesetzt (Kobayashi et al., 1973, 1980).

In dieser Arbeit werden verschiedene Verfahren, wie Elektrodialyse, Reaktivextraktion und Kristallisation, mit dem Ziel der Aufarbeitung von Itaconsäure betrachtet. Dabei kommen verschiedene Prinzipien zur Trennung wie elektrische Ionenladung, Veränderung der Temperatur und damit der Löslichkeit, sowie spezifische chemische Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zur Anwendung.

2.3.1 Elektrodialyse

Bei dem Prozess der Elektrodialyse (ED) werden mit Hilfe von Ionenaustauschermembranen und der treibenden Kraft einer elektrischen Potenzialdifferenz geladene Bestandteile aus einer wässrigen Lösung abgetrennt. Die Elektrodialyse wird zur Entsalzung von Meer- und Brackwasser eingesetzt.

Weitere Anwendungsgebiete sind in der Aufbereitung von Industrieabwässern, in der Lebensmittelindustrie, in der Chemie (Strathmann and Chmiel, 1984), sowie in der Medizintechnik und in der Biotechnologie zu finden. Die Aufarbeitung mittels Membrantrennverfahren zeigt folgende Vorteile (Rapp, 1995):

- Trennprozesse erfolgen bei Raumtemperatur, so dass keine thermischen Beschädigungen der Wertstoffe auftreten
- kontinuierliche Fahrweise ist möglich
- Die Anlagen sind relativ unkompliziert und kostengünstig.

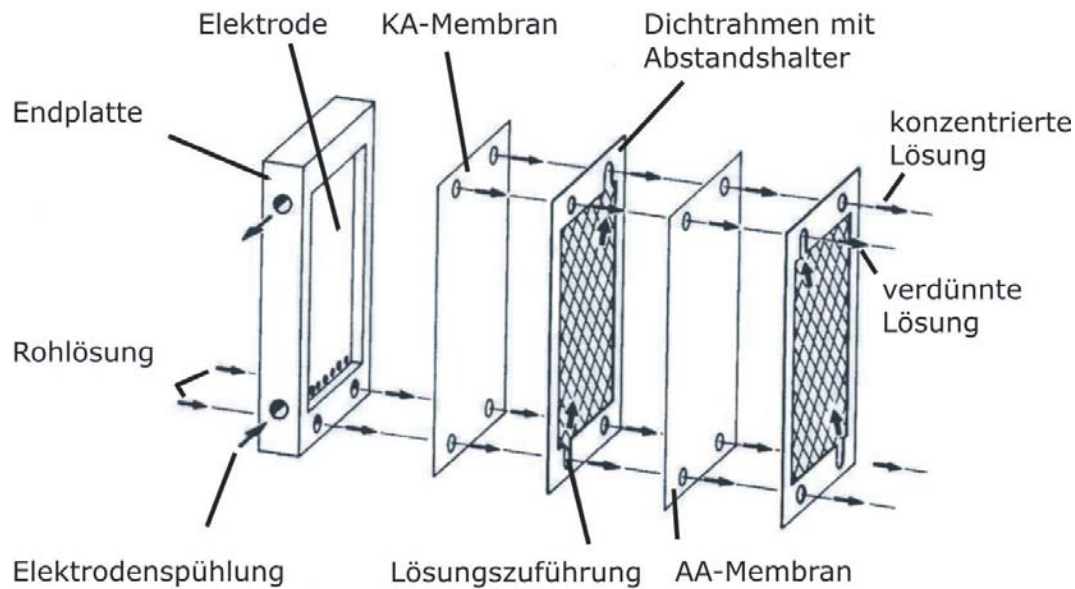


Abbildung 2.5: Modularer Aufbau des Elektrodialyse-Stapels

- Durch Entwicklung und Auswahl geeigneter Membranen kann eine Anpassung an das Trennproblem erfolgen.
- „scale up“ ist möglich

In der Biotechnologie wird die ED z.B. eingesetzt um kontinuierlich Milch- und Itaconsäure von Fermentationsbrühen abzutrennen. Diese Technik stellt eine umweltfreundliche Alternative zur konventionellen Zitronensäureaufarbeitung dar, bei welcher enorme Mengen an Calciumsulfat anfallen, die entsorgt werden müssen (Moresi and Sappino, 2000). Je nach Anwendung wird das ED-Modul mit mono- oder bipolaren Membranen in unterschiedlicher Reihenfolge bestückt (Xu, 2002; Moresi and Sappino, 2000; Rapp, 1995). Die elektrolytische Wasserdissoziation an bipolaren Membranen kann genutzt werden, um Salze wie z.B. Na_2SO_4 in Säuren und Laugen zu überführen (Strathmann and Chmiel, 1984). Die Elektrodialyse wird als batch- oder kontinuierliche Arbeitsweise sowie bei Gleichspannung oder konstanter Stromdichte betrieben.

2.3.1.1 Aufbau der Elektrodialyse

Die ED-Einheit, auch als Membranstapel (Stack) bezeichnet (Abbildung 2.5), besteht aus einer Vielzahl von Zellen, die alternierend von Anionen- und Kationenaustauschermembranen begrenzt sind und zwischen einer Anode und Kathode angeordnet sind. Die Endplatten enthalten die Zuflüsse für die internen Kreisläufe der Elektrodenpülung, den Diluat- und Konzentratkreislauf. Zwischen den Membranen sind als Abstandhalter und für eine gute hydrodynamische Durchmischung Spacer (Abstandhalter mit Dichtrahmen) eingebracht (Strathmann and Chmiel, 1984).

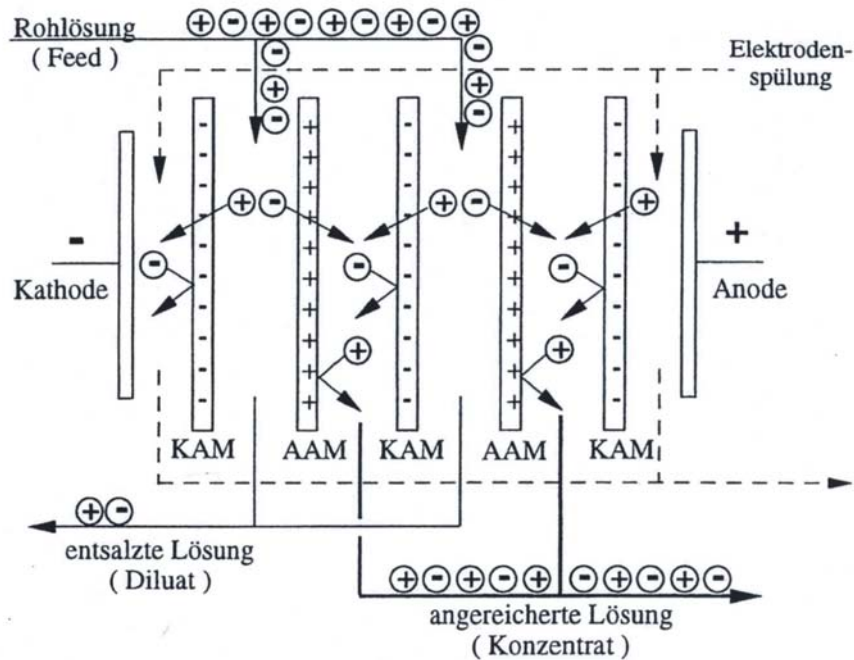


Abbildung 2.6: Funktionsprinzip der Elektrodialyse

2.3.1.2 Funktionsprinzip

Das Prinzip der Elektrodialyse besteht in der Migration von elektrisch geladenen Teilchen in einer Elektrolytlösung. Die geladenen Teilchen bewegen sich im elektrischen Feld und werden mit Hilfe von Ionenaustauschermembranen aus einer Lösung entfernt (Abbildung 2.6). Wiederholende Anordnungen bestehend aus einer Kationenaustauschermembran (KAM), einer Diluatkammer, einer Anionenaustauschermembran (AAM) und einer Konzentratkammer, den so genannten Zellpaaren, werden in einem Modul (Stack) hintereinander geschaltet. (Rapp, 1995). Die Ionenaustauschermembranen können selektiv nur von einer Ionensorte passiert werden. Dadurch kommt es zur Anreicherung bzw. Abreicherung geladener Bestandteile in den Kompartimenten zwischen den Membranen. Die abgereicherte Lösung wird als Diluat und die angereicherte Lösung als Konzentrat bezeichnet.

- **Ionenaustauschermembranen** bestehen aus einer Polymermatrix mit fest an die Membran gebundenen geladenen Gruppen, den so genannten Festionen und den frei beweglichen Ladungsträgern (Abbildung 2.7). Die beweglichen Ionen mit entgegengesetzter Ladung der Festionen werden Gegenionen genannt. Die beweglichen Ionen mit gleicher Ladung wie die Festionen werden Co-Ionen genannt. Starke Coulomb-Kräfte bewirken einen Ausgleich der Festionenladungen durch entsprechend viele entgegengesetzt geladene Gegenionen. Bei Ladungsausgleich herrscht innerhalb der Membran freie Beweglichkeit für die Gegenionen, weshalb diese auch ausgetauscht werden können.

Ionenaustauschermembranen mit negativen Festladungsträgern lassen bevorzugt de-

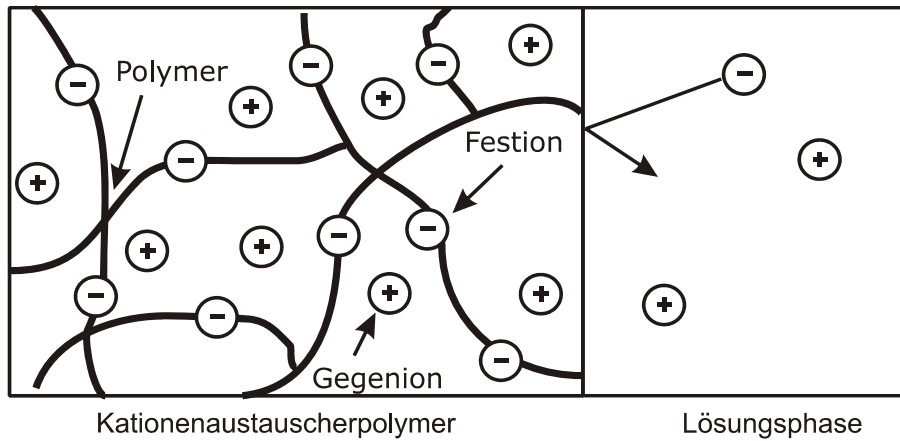


Abbildung 2.7: Kationenaustauscherpolymer mit angrenzender verdünnter Lösung

ren Gegenionen, die Kationen, passieren und werden daher Kationenaustauschermembran (KAM) genannt. Sie wirken als Barriere für Anionen. Ionenaustauschmembranen mit positiven Festladungsträgern lassen bevorzugt deren Gegenionen, die Anionen, passieren und werden daher Anionenaustauschermembran (AAM) genannt. Sie wirken als Barriere für Kationen. Dieser Ausschlusseffekt bewirkt die für Ionenaustauschmembranen charakteristische Selektivität (Rapp, 1995).

• Ionentransport im elektrischen Feld

In einem Elektrolyten wird durch die beweglichen Ionen der elektrische Strom I übertragen. Anhand des Faradayschen Gesetzes errechnet sich der elektrische Strom I aus der Summe aller Einzelströme \dot{N}_j (Konvektionsfluss, diffusiver und migrativer Ionentransport) multipliziert mit der Wertigkeit z_j der jeweiligen Komponente, der Faraday-Zahl F und der vom Strom durchflossenen Fläche A (Rapp, 1995):

$$I = F * A \sum_{j=1}^J z_j \dot{N}_j \quad (2.3)$$

Wird dieser Zusammenhang mit der Stromdichte i beschrieben, so formt sich das Faradaysche-Gesetz zu :

$$i = \frac{I}{A} = F \sum_{j=1}^J z_j \dot{N}_j \quad (2.4)$$

Wird an den Elektroden der ED Elektrizität angelegt, wandern alle positiv geladenen Ionen (Kationen) zu der Kathode und alle negativ geladenen Ionen (Anionen) zur Anode. Die KAM mit negativ geladenen Festionen erlauben den Transport der Kationen aber weisen den Transport der Anionen ab. Die AAM wirken dementsprechend invers. Wenn die Ionen vom Diluat ins Konzentrat wandern, werden Wassermoleküle (Hydrathülle der Ionen) gleichzeitig durch die Membranen transportiert. Dieser Nettofluss von Wasser über die Membran wird auch als Elektroosmose bezeichnet (Ling et al., 2002).

• Grenzstromdichte

Ein Trennprozess wird nach der erzielten Produktreinheit beurteilt. Bei Elektromembranverfahren hängt dieses maßgeblich von der Selektivität der eingesetzten Ionenaustauschermembranen ab. AAM sind im Idealfall nur durchlässig für das abzutrennende Anion. Es kommt aber zum Mittransport anderer Anionen, z.B. andere organische Säuren, so dass der Konversionsgrad sinkt.

Idealerweise ist die Membran nur für das abzutrennende Anion durchlässig, so dass dieses in der Membran eine sehr hohe Beweglichkeit besitzt. In der Lösungsphase ist die Beweglichkeit geringer, da auch andere Ionen im Feld migrieren. Der migrative Nachtransport des abzutrennenden Anions (Gegenion) aus der Lösung ist somit geringer, als der Abtransport des Ions über die Membran, wodurch sich eine Konzentrationsdifferenz ergibt. Beiderseits der Membran bilden sich Diffusionsgrenzschichten. Steigert man die Stromdichte (siehe Gleichung 2.4), steigt der Konzentrationsgradient in der Grenzschicht. Auf der Seite des Diluates sinkt die Konzentration der permeierenden Ionen (abzutrennendes Anion), wohingegen sie auf der Konzentratsseite zunimmt. Die Stromdichte kann solange erhöht werden, bis am Übergang von Grenzschicht zu Membran (diluatseitig) die Konzentration des Ions auf nahe null sinkt. Es fehlen freie Ladungsträger für den Stromtransport. Die diesem Zustand zugeordnete maximale Stromdichte wird als Grenzstromdichte i_{lim} bezeichnet (Cowan and Brown, 1959; Novalic et al., 1995; Rapp, 1995).

Ist die Konzentration der Ionen auf fast Null gesunken, so setzt die Spaltung von Wassermolekülen ein. Es bilden sich H^+ und OH^- Ionen die den Ladungstransport übernehmen. Dies ist aus folgenden Gründen unerwünscht:

- Wasserspaltung ist ein energiezehrender Vorgang, was sich negativ auf die Stromausbeute auswirkt.
- Es findet eine starke Verschiebung des pH-Wertes statt (Absenkung im Diluat, Anhebung im Konzentrat). Dieses kann dazu führen, dass das Löslichkeitsprodukt des Ions (IA) überschritten wird und es zu Ablagerungen auf oder in der Membran kommt. Die Ablagerungen auf den Membranen vermindern die effektive Membranfläche und es kann zur Zerstörung der Membran kommen (Rapp, 1995).

Eine Elektrodialyse-Anlage wird aufgrund der Investitionskosten mit der minimal benötigten effektiven Membranfläche betrieben. Diese kann mit Hilfe der Grenzstromdichte i_{lim} bestimmt werden. Beim spannungskonstanten Betrieb gibt es eine Grenzspannung. Pro Membran im Elektrodialyse Modul kann eine Spannung von 1-1,5 Volt angelegt werden (Strathmann and Chmiel, 1984).

2.3.1.3 Kennzahlen der Elektrodialyse

Ein Elektrodialyse Prozess kann durch anlagen- und prozessspezifische Kennzahlen beurteilt werden (Moresi and Sappino, 2000):

- Konversionsgrad: Maß für den Erfolg der ED bzw. eines Verfahrens; Menge übergegangener Itaconsäure in Prozent [%]
- elektr. Energie: $E = U * I * t$ [kWh]
- spezifischer Energieverbrauch: ϵ [kWh/kg IA]
- Raum-Zeit Ausbeute (Massentransfer): RZA [mmol/(lh)]
- Widerstand: $R = U/I$ [Ω]
- Elektrische Ladungsmenge: $Q = I * t$ [C] bzw. [Ah]

Bei der Elektrodialyse mit konstanter Betriebsspannung fällt der Strom nicht linear ab. Daher wird die elektrische Ladungsmenge Q über die Integration der Stromstärke über die Elektrodialyse Zeit in Stunden bestimmt. Der Abbruch der Elektrodialyse wird über den elektrischen Widerstand R ermittelt. Der elektrische Widerstand ist als Kehrwert des Leitwertes G (Leitfähigkeit) definiert.

2.3.2 Flüssig/Flüssig-Extraktion

Die Flüssig/Flüssig-Extraktion ist ein thermodynamisches Verfahren, bei der bestimmte Substanzen aus flüssigen Stoffgemischen mittels Lösungsmittel selektiv herausgelöst, ausgewaschen oder ausgelaugt werden. Das Lösungsmittel (Extraktionsmittel E) entzieht dem Gemisch aus Trägerstoff und dem abzutrennendem Stoff X (Raffinat $R + X$) diesen Stoff X . Für den Stoffaustausch ist eine intensive Durchmischung des Raffinates (wässrige Phase) mit dem Extraktionsmittel (organische Phase) notwendig, um eine ausreichende Kontaktzeit für den Austausch zu erzielen. Der sich nun im Extraktionsmittel befindende Stoff X kann in einem weiteren Verfahrensschritt (Reextraktion) herausgelöst werden. Die Voraussetzung einer Flüssig/Flüssig-Extraktion ist die Nichtlöslichkeit von Trägerstoff und Extraktionsmittel, bzw. eine genügend große Mischungslücke. In Abhängigkeit von der zu extrahierenden Substanz werden organische oder anorganische (Wasser) Lösungsmittel eingesetzt (Mersmann, 2005).

Einsatzbereiche für Extraktionsverfahren sind z.B.:

- Abwasserreinigung: Aceton beladener Abwasserstrom gereinigt mit Toluol; Entfernung von Säureresten aus wässrigen Mischungen
- Aufreinigung: Organische Säuren aus Fermentationsbrühen
- Hydrometallurgie: Metallsalzgewinnung, Aufarbeitung von Kernbrennstoffen

Die Reaktivextraktion nutzt zusätzlich eine Reaktivkomponente, die mit dem Stoff X in Wechselwirkung tritt. Es bildet sich ein Komplex aus dem ionisierten Stoff X und einem Ion mit entgegengesetzter Ladung. Dieser Komplex ist weniger hydrophil und kann so besser in die organische Phase extrahiert werden. Die Reaktivextraktion findet z.B. Anwendung bei:

- Extraktion von Lebensmittelfarben: Dabei wurden Tetrabutylammonium und Trioctylamin eingesetzt. Trioctylamin war aufgrund der höheren Hydrophobizität besser geeignet und wurde für die Extraktion von Benzoesäure und Salicylsäure untersucht (Puttemans et al., 1984a).
- Rückgewinnung von Carbonsäuren:
 - **Citronensäure:** Bei der kontinuierlichen Fermentation des Pilzes *Aspergillus niger* wird die produzierte Citronensäure aus der Fermentationsbrühe mit einem Gemisch aus Octanol, Kerosin und Tridocylamin extrahiert. Anschließend wird die abgereicherte Fermentationsbrühe über Aktivkohle geleitet und in den Fermenter zurückgeführt (Wieczorek and Brauer, 1998).
 - **Essigsäure/Milchsäure:** Ein Gemisch aus 1-Butanol und Trihexylamin (THA) erwies sich bei der Extraktion von Essigsäure im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln, wie Octanol, Ethylhexanol, Diisopropylether, Diisopropylketon, Methylisobutylketon und Toluol, sowie anderen Tri-n-Alkylaminen als geeignetes Extraktionssystem.
Dieses Extraktionssystem wurde auf die Milchsäureaufreinigung erfolgreich übertragen. Zur anschließenden Trennung des Butanol-Wasser-THA-Milchsäure-Gemisches wurde das Butanol und Wasser abdestilliert und die Säure in einem weiteren Schritt mit einer konzentrierten Ammoniaklösung reextrahiert. Der Einsatz von längerkettigen Tri-n-Alkylaminen, wie Trioctylamin, zeigte keine signifikante Verbesserung des Extraktionserfolges (Jung et al., 2000).
 - **Gluconsäure:** Mittels der Reaktivextraktion wird die Gluconsäure aus Fermentationslösungen isoliert. Als optimales Trennsystem wurde 1-Butanol als Lösungsmittel und Trioctylamin als Reaktivkomponente ermittelt (Hirth et al., 2002).

Aufbauend auf obigen Erkenntnissen werden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Extraktion, mit verschiedenen Lösungsmitteln und Trioctylamin, von Itaconsäure aus der Fermentationsbrühe durchgeführt.

- **Trioctylamin** (N,N-Dioctyl-1-octaamin, Abbildung 2.8) hat ein Molekulargewicht von 353,68 g/mol und stellt aufgrund des freien Elektronenpaares am zentralen Stickstoffatom und der langen Alkylreste einen Elektronendonator mit einer hohen Lewis Basizität dar. Aufgrund dessen besitzt es eine hohe Affinität zur Anlagerung acider Moleküle (Komplexbildung) und eignet sich zur Reaktivextraktion von organischen Säuren (Hirth et al., 2002). Der Komplex wurde durch infrarotspektroskopischer Untersuchungen sowie der Interpretation von Massenwirkungsbeziehungen näher beschrieben (Tamada and King, 1990). Dabei tritt das erste Säuremolekül direkt mit dem Amin in Wechselwirkung und bildet einen (1,1)-Komplex (Abbildung 2.9), dessen Bindungscharakter zwischen dem einer Ionenpaar- und einer Wasserstoffbrückenbindung liegt.

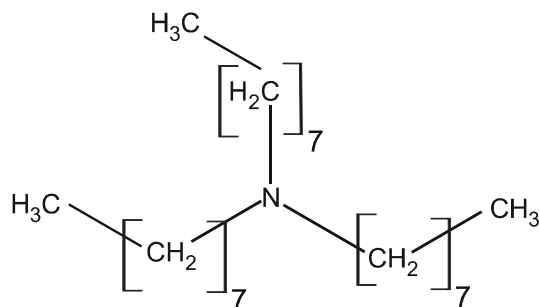


Abbildung 2.8: Strukturformel Trioctylamin (TOA)

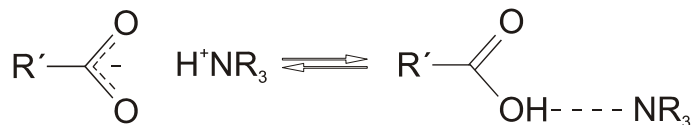


Abbildung 2.9: Bindungscharakter des (1,1)-Komplexes

- **Butanol** besitzt eine Hydroxylgruppe und konkurriert mit anderen Säuremolekülen um die Anlagerung an die zweite Carboxylgruppe des Säuremoleküls im (1,1)-Komplex und dient als Lösungsmittel für den Amin-Säure-Komplex. Dabei stabilisiert das Lösungsmittel den Komplex über eine Wasserstoffbrückenbindung (Abbildung 2.10).

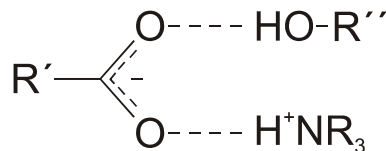


Abbildung 2.10: Solvation des Komplexes

Für die Reaktivextraktion organischer Säure, vor allem für Gluconsäure, eignet sich Butanol aufgrund der kurzen Alkylkette optimal als Lösungsmittel (Hirth et al., 2002). Da es die maximale Wechselwirkung mit dem Komplex aufweist erhöht es den Verteilungskoeffizienten K des Stoffes X in Bezug auf die organische Phase.

$$K = \frac{c_{\text{organische Phase}}}{c_{\text{wässrige Phase}}} \quad (2.5)$$

Die Dissoziation einer organischen Säure wird über den pH-Wert beeinflusst. Die Itaconsäure kann daher mittels Extraktion und Reextraktion⁷ aufgearbeitet werden. Bei einem niedrigen pH-Wert liegt die undissoziierte Form der Säure vor und wird in die organische Phase extrahiert. Bei einem pH-Wert Anstieg reichert sie sich in der wässrigen Phase an und wird somit reextrahiert (Hirth, 2003).

Für die Eignung einer möglichen In-situ Produktabtrennung soll die Extraktion der IA mit längererkettigen Alkoholen getestet werden, da die Löslichkeit des Lösungsmittels in der

⁷Rückgewinnung der Itaconsäure in die wässrige Phase mittels wässriger Ammoniaklösung

wässrigen Phase mit zunehmender Kettenlänge abnimmt (Tabelle 2.5). Außerdem muss untersucht werden inwieweit die IA-Produktion durch Spuren dieses Extraktionssystems beeinflusst wird.

Tabelle 2.5: Wasserlöslichkeit (w/w) organischer Lösungsmittel bei 20 °C (1-Butanol, 1-Octanol), 25 °C (1-Decanol) (Merck, 2003)

	1-Butanol	1-Octanol	1-Decanol
Löslichkeit [g/1000g]	77	0,3	0,037

2.3.3 Kristallisation

Die Kristallisation ist ein physikalisches Verfahren. Eine mit gelöstem Feststoff gesättigte Lösung wird abgekühlt und der Feststoff fällt aus. Es findet Einsatz bei der Reinigung eines kristallinen Rohproduktes, das heißt bei der Abtrennung von:

- Physikalischen Verunreinigungen (z.B. Biomasse)
- Chemischen Verunreinigungen (Nebenprodukte, z.B. organische Säuren)

Das Hauptziel in der Verfahrenstechnik ist die Produktisolierung mit einer möglichst hohen Reinheit und Qualität. Wird die Sättigungstemperatur ausreichend unterschritten, bilden sich Kristallkeime der auszukristallisierenden Komponente, es kommt zur Phasenumwandlung und zum Ausfall fester Kristalle (mikrokristallines Pulver oder kristalline Substanz), welche anschließend abfiltriert werden können (Kreitmeier, 2001). Der Prozess kann bis zum Erreichen der gewünschten Qualität mehrfach wiederholt werden (Storhas, 2003). Aufgrund des stark temperaturabhängigen Löslichkeitsverhaltens der Itaconsäure ist eine Kristallisation als Aufarbeitungsschritt möglich (Abbildung 2.11) (Pfizer, 1972).

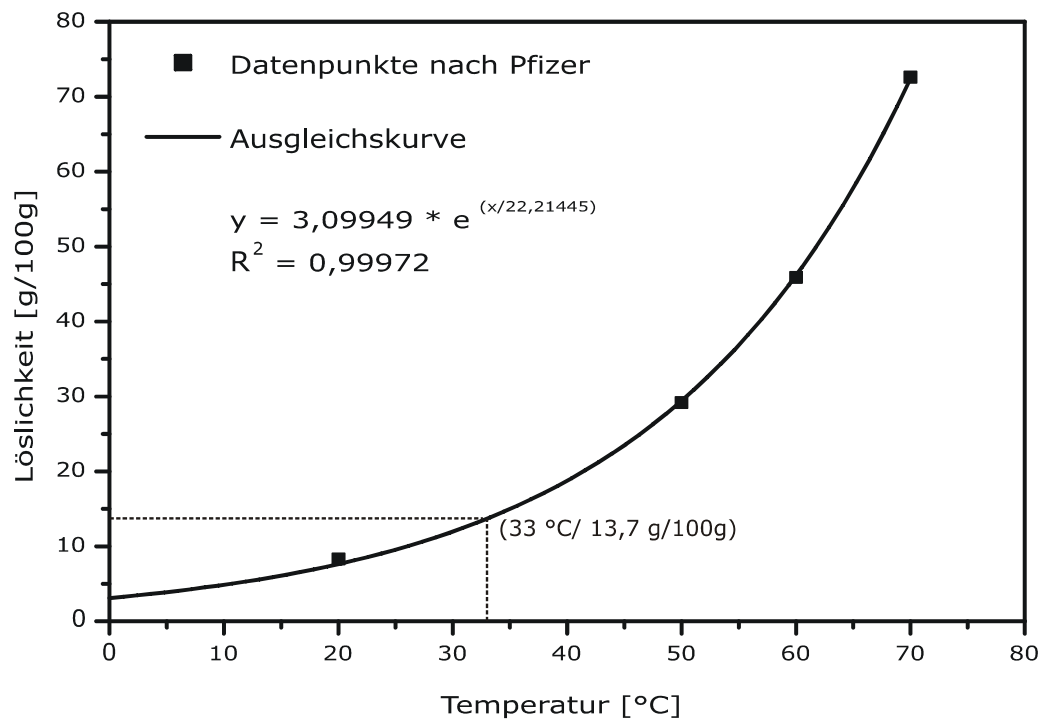


Abbildung 2.11: Wasserlöslichkeitskurve der Itaconsäure nach Pfizer (Pfizer, 1972)

Kapitel 3

Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem filamentös wachsenden Pilz *Aspergillus terreus* durchgeführt. Im folgendem werden die Kultivierungsbedingungen sowie die eingesetzte Analytik beschrieben. Während der gesamten Arbeit wurden Sporensuspensionen und beimpfte Medien mit schräg abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert. Weiterhin wurden alle Lösungen mit Reinstwasser angesetzt (Millipore, Milli Qplus 185).

3.1 Kultivierungsbedingungen

3.1.1 Organismus/Stammmhaltung

In dieser Arbeit wurden die Stämme *Aspergillus terreus* aus den Jahren 1960 und 1963 kultiviert, die im Northern Research Laboratory (NRRL) isoliert wurden sind. Zur Untersuchung und Optimierung der Itaconsäureproduktion diente der an der FAL gescreeente Stamm *Aspergillus terreus* LU02b. Eine Stammidentifizierung der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) ergab die Zugehörigkeit zu „*Aspergillus terreus* Thom“.

Die Stammmhaltung erfolgte in Form von Kryostockkulturen bei -80 °C in sterilem Glycerin (≈ 50 Vol.-%). Um Mutationen des Stamms zu vermeiden und für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuchsansätze wurden alle Versuchsreihen mit frisch hergestellten Arbeitskulturen durchgeführt.

- **Herstellung der Arbeitskult**

Zur Herstellung der Arbeitskult wurde eine Stammkult bei Raumtemperatur aufgetaut. Je Agarplatte (Czapek-Dox Agar (Merck), je nach Anzahl der Versuche zwischen 6 und 20 Stück) wurden 60 μ l Sporensuspension/Glycerin-Gemisch der Stammkult mit einem sterilen Glasspatel ausplattiert und vier Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 6 ml NaCl-Lösung (0,9 % w/v) auf die bewachsene Agarplatte pipettiert und die Sporen mit einer Platinimpföse in der Lösung suspendiert. Die Sporensuspensionen der einzelnen Agarplatten wurden in eine sterile

Schottflasche überführt. Die Konzentration dieser Suspension wurde mittels Zählkammer (Kapitel 3.2.5, Seite 43) bestimmt und die Sporensuspension diente als Inokulum für die Versuche.

- **Herstellung der Kryostockkultur (Stammkultur)**

Czapek-Dox Agarplatten (Merck), wurden mit der Sporensuspension beimpft. Nach einer viertägigen Inkubation bei 30 °C erfolgte die Ernte der Sporen. Dazu wurden ca. 6 ml NaCl-Lösung (0,9 % w/v) auf die bewachsene Agarplatte pipettiert und die Sporen mit einer Platinimpföse in der Lösung suspendiert. Die Sporensuspension wurde in eine autoklavierte (20 Minuten, 121 °C) Schottflasche überführt. In 2 ml sterile Kryogefäße wurden je 700 µl steriles Pharmaglycerin vorgelegt. Das gleiche Volumen an Sporensuspension wurde hinzu pipettiert und gut vermischt. Anschließend erfolgte eine Schockfrierung mittels flüssigem Stickstoff und eine Lagerung bei -80 °C.

3.1.2 Medien und Kultivierungsbedingungen

Das optimierte Standardproduktionsmedium ist in der Tabelle 3.1 dargestellt. Die Medienkomponenten wurden getrennt als Stammlösungen angesetzt und der pH-Wert jeweils mit 1 M H_2SO_4 auf 3,1 eingestellt. Die Stammlösungen wurden anschließend separat bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert, um mögliche Veränderungen/Reaktionen der Substanzen bei hohen Temperaturen z.B. Maillard-Reaktion auszuschließen. Bei der $CaCl_2$ Lösung wurde der pH-Wert nicht eingestellt um ein Ausfällen von $CaSO_4$ zu vermeiden. Die $FeCl_3 + H_2O$ Lösung wurde nicht autoklaviert sondern steril filtriert. Die Glucose wurde in der Menge Wasser gelöst, so dass das Gesamtvolumen des Glucose/Wasser Gemisches zusammen mit den Einzelvolumina der Stammlösungen 1 l betrug (Glucose/Wasser Gemisch = 865,69 ml). Der pH-Wert des Glucose/Wasser Gemisches wurde mit 1 M H_2SO_4 auf 3,1 eingestellt und sterilisiert (121 °C, 20 Minuten).

Die Zusammenstellung des Mediums aus den Stammlösungen erfolgte aseptisch unter der Sterilwerkbank.

Tabelle 3.1: Standardproduktionsmedium für die Kultivierung von *Aspergillus terreus*

Komponente	M	c _{soll}	Stammlsg.	Einwaage	Element	c(x) _{soll}
	g/mol	g/l	g/l	ml/l	x	mg/l
KH ₂ PO ₄	136,02	0,1	16	6,25	K/PO ₄	28,7/69,8
NH ₄ NO ₃	80	3	80	37,5	N (NH ₄)	525
MgSO ₄ *7H ₂ O	246,5	1	20	50	Mg/S	98/13
CaCl ₂ *2H ₂ O	146,97	5	200	25	Ca	1363
FeCl ₃ *6H ₂ O	270,19	0,00167	0,3	5,56	Fe	0,345
ZnSO ₄ *7H ₂ O	287,45	0,008	1,6	5	Zn	1,82
CuSO ₄ *5H ₂ O	249,6	0,015	3	5	Cu	3,82
Glucose	180,16	120-180		ad. 1 l		
H ₂ O _{Millipore}	18					

3.1.3 Kultivierung von *Aspergillus terreus* in Schüttelkolben

Die Kultivierung wurde in 250 ml Schüttelkolben mit drei Schikanen und 100 ml Arbeitsvolumen (Medium siehe Tabelle 3.1) durchgeführt. Alle Versuche erfolgten mindestens im Doppelansatz, bei 120 Upm (50 mm Auslenkung des Schüttlers) und 33 °C.

• Durchführung der Kultivierung

Das Standardproduktionsmedium (Tabelle 3.1) wurde für einen Versuchsansatz in einer autoklavierten Schottflasche mit Rührkern angesetzt, mit der entsprechenden Menge an Sporen (Herstellung siehe Kapitel 3.1.1) zu einer Endkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Sporen/ml angeimpft und anschließend auf die Schüttelkolben (je 100 ml) aufgeteilt. Die Kolben wurden gewogen und bei 33 °C inkubiert.

• Probenahme

Für die Probenahme (einmal täglich) wurde jeder Kolben einzeln dem Schüttler entnommen und während der gesamten Probenahme per Hand weiter geschüttelt, um die Sauerstoffversorgung zu sichern. Zu Beginn der Probenahme wurde der Kolben gewogen, die Gewichts Differenz bestimmt und äquivalente Menge an sterilem Reinstwasser nachdosiert. Unter der Sterilwerkbank wurden je Kolben zweimal 1 ml Kulturbrühe entnommen und für die Biotrockenmassenbestimmung (Kapitel 3.2.1, Seite 38), für die HPLC Analytik (Kapitel 3.2.2, Seite 39) sowie für die externe pH-Wert Messung (Kapitel 3.2.3, Seite 42) verwendet. Anschließend wurde erneut das Gewicht notiert und der Kolben zurück in den Inkubator platziert.

Tabelle 3.2: Geräteliste für die Kultivierung von *Aspergillus terreus* im Schüttelkolben

Gerät	Typ	Hersteller
Inkubatoren	Minitron; 50 mm Schwenkbewegung	MT INFORS, Bottmingen
Trockenschrank	UE 400 1400 W	Memmert, Schwabach
Autoklav	2540 ELC	Tuttnauer, Breda Niederlande
Autoklav	Fedegari	Tecnomara AG, Zürich
Sterilwerkbank	HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau
Waage	Ew 3000-2M	KERN EW, Balingen
Analysenwaage	Sartorius AnalyticA 200S.	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke, Staufen
Schüttler	TOP-MiX 94323 Bioblock Scientific	Heidolph, Balingen
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
pH Elektrode	InLab Micro	Mettler Toledo, Giessen

3.1.4 Kultivierung von *Aspergillus terreus* in der 1,5 l Multi-fermentieranlage

Die verwendete Multi fermentieranlage ist ein Fermenterstand mit vier baugleichen maßangefertigten 1,5 l Glasrührreaktoren (Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden-Lengler). Der Aufbau der vier Reaktoren, inklusiv die Anordnung der Einbauten, war identisch, es wurden die gleichen Messgeräte und Elektronen verwendet, um reproduzierbar und vergleichend kultivieren zu können.

Die Betriebsparameter einer Standardfermentation sind:

- 1 l Arbeitsvolumen, Standardproduktionsmedium (Tabelle 3.1)
- 33 °C
- 25 % Sauerstoffsättigung
- 470 Upm Rührerdrehzahl
- Start pH 3,1 unregelt
- Inokulum: Sporen, $1 \cdot 10^6$ Sporen/ml

3.1.4.1 Aufbau der Multi fermentieranlage

Die vier Reaktoren besitzen je einen Doppelmantel für die Temperierung über einen externen Thermostaten, einen PEEK (Polyetheretherketon)-Deckel mit den möglichen Ansatzstutzen für Elektroden, Begasung¹, Abluft, Probenahme sowie für das Rührgestänge (Abbildung 3.1). Zwischen dem PEEK-Deckel und dem Glasreaktor wird in einer dafür vorgesehenen Nut ein Silikondichtring eingelegt und der Deckel und Reaktor mittels eines Metallspannrings luftdicht verschlossen.

Die Messgeräte der pH-, Redox- sowie Sauerstoffelektroden wurden über eine analog/digital Schnittstelle an den Computer angeschlossen und die Daten von der Software DaisyLab 6.0 weiter verarbeitet. Die Begasung des Fermenter 1 erfolgte mittels eines Sauerstoffreglers (Low-P-Flow, Bronkhorst HiTech, Ruurlo NL) Software gesteuert, wohingegen die Begasungsraten der Fermenter 2-4 manuell an dem Nadelventil eingestellt wurden.

3.1.4.2 Durchführung einer Kultivierung

1. Zusammenbau der Bioreaktoren:

Die Glasreaktoren wurden gründlich gereinigt, getrocknet und anschließend mit dem Substrat und Reinstwasser befüllt. Der pH-Wert wurde mit 1 M H_2SO_4 auf pH 3,1 eingestellt. Die benötigten Komponenten, wie Belüftung, Rührer, Probenahme,

¹Die Druckluft wird über ein Vordruckminderer auf 1 bar begrenzt, der Luftstrom wird mittels Nadelventil versuchsabhängig eingestellt und über einen Sterilfilter, $0,22 \mu\text{m}$, in die Edelstahlfritte des Reaktors eingeleitet.

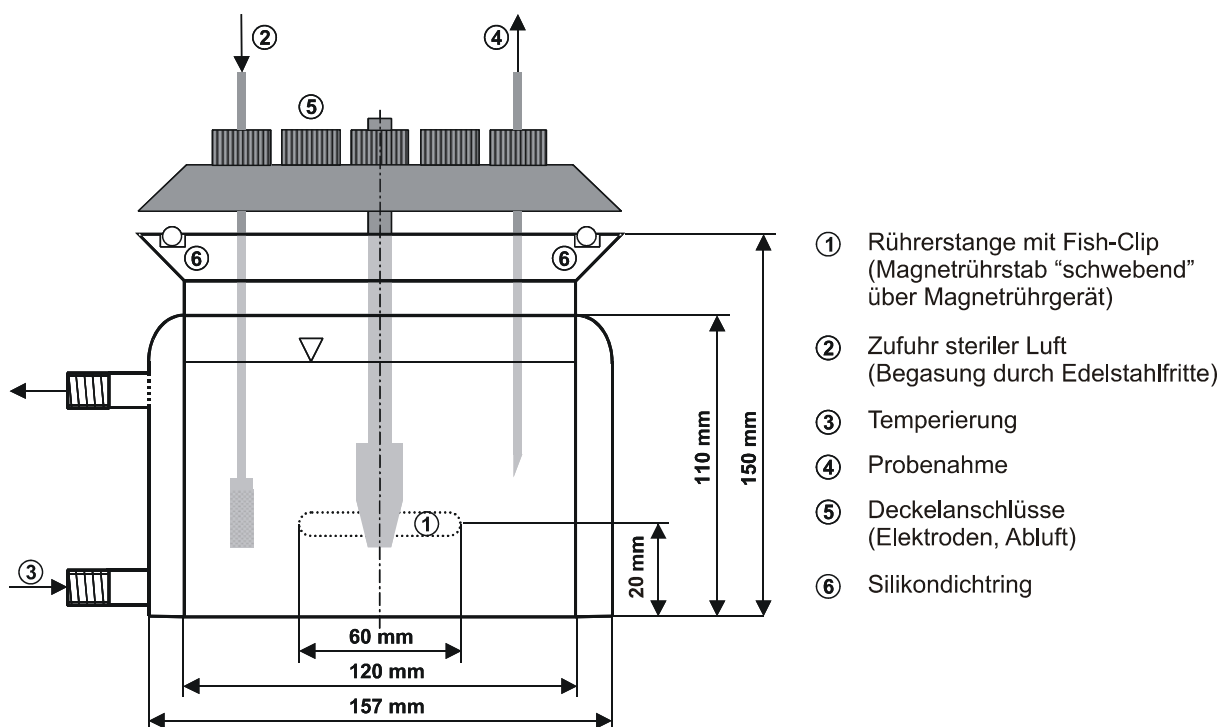


Abbildung 3.1: Reaktoraufbau und Abmessungen des 1,5 l Glasrührreaktors

Abluft und Öffnungen für Elektroden wurden installiert und das Gewicht der zum Autoklavieren fertigen Reaktoren wurde bestimmt.

2. Sterilisation der Bioreaktoren:

Die Reaktoren wurden in einem Autoklav für 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Reaktoren auf Raumtemperatur erfolgte ein erneutes Wiegen und die Gewichts Differenz, die Menge des verdunsteten Wassers, wurde durch Zugabe von sterilem Reinstwasser ausgeglichen.

3. Start der Kultivierung:

Die sterilen Fermenter wurden an den Fermenterstand angeschlossen, d.h. sie wurden in Reihe an den Thermostaten angeschlossen und die Temperierung auf 33 °C gestartet. Weiterhin wurden die Abluftkühler (Glasrückflusskühler) in Reihe an den Kühlkreislauf des Kryostaten angeschlossen und auf 2 °C temperiert.

Die Sauerstoffelektroden wurden gereinigt, der Elektrolyt gewechselt, mindestens sechs Stunden polarisiert und anschließend oberflächendesinfiziert in die Reaktoren eingebaut. Die Redoxelektrode wurde mit einem Redoxpuffer überprüft und ebenfalls oberflächendesinfiziert eingesetzt. Die separat sterilisierten Lösungen der Salze und Spurenelemente (Tabelle 3.1, Seite 29) wurden unter der Sterilbank in einer sterilen Animpfflasche zusammengefügt und den Reaktoren zugegeben.

Nachdem die Temperatur der Reaktorinhalte 33 °C betrug wurden die Reaktoren stark begast um das Medium mit Sauerstoff zu sättigen. Anschließend wurde die

Zuluft wieder geschlossen, die Sauerstoffelektroden kalibriert und das Medium mit $1 \cdot 10^6$ Sporen/ml beimpft. Gleichzeitig wurde die Datenaufnahme der online Messungen (Redoxsignal, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck sowie bei Fermenter 1 die Sauerstoffregelung) gestartet.

4. Fermentationsverlauf

Die Keimung der Sporen und damit die Sauerstoffzehrung setzte innerhalb der ersten 8 h ein. Fiel der Sauerstoffpartialdruck infolge der Sauerstoffzehrung des Pilzes unter 20 % wurde bei den Fermenter 2-4 die Zuluft über das Nadelventil manuell geöffnet. Im Fermenter 1 setzt die Zuluftregelung durch die Software beim Unterschreiten eines gewissen Levels ein und hielt den Sauerstoffpartialdruck konstant auf 25 %.

Nach dem Start der Belüftung wurde zur Vermeidung von Schaumbildung je Reaktor 0,3 ml Antischaummittel (Ucolup N-115, Brenntag Mühlheim/Ruhr) zugegeben. Während der Wachstumsphase wurde zweimal täglich eine Probe mittels steriler Einwegspritzen (10 ml sterile Spritze, je 3 ml Probe) entnommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und wie in Kapitel 3.2.1, Seite 38 beschrieben sofort aufgearbeitet. Während der stärksten Produktionsphase wurde dreimal täglich und am Ende der Kultivierung einmal täglich Proben entnommen und aufgearbeitet. Eine Standardkultivierung dauerte zwischen 8 und 10 Tage.

5. Abbruch der Kultivierung

Die Kultivierung wurde beendet wenn durch die zeitnahe HPLC Analytik (Kapitel 3.2.2, Seite 39) keine wesentlichen Veränderungen der IA-Produktion sowie des Glucoseverbrauchs ermittelt wurden. Die Datenaufzeichnung durch DaisyLab wurde gestoppt, die Messgeräte ausgeschaltet, die Elektroden ausgebaut, desinfiziert und gereinigt. Die Reaktoren wurden abgebaut, 20 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert und anschließend gründlich gereinigt.

3.1.5 Kultivierung von *Aspergillus terreus* im 3 l Umwurfreaktor

Der 3 l Glas-Umwurfreaktor der Firma Meredos besaß ein Leitrohr aus Glas sowie einen Propellerrührer, mit Antrieb von oben (Abbildung 3.2).

Die Temperierung erfolgte über einen externen Thermostaten der den Fermenterinhalt über drei Edelstahlrohre, die gleichzeitig das Innenrohr zentriert hielten, erwärmte. Die Temperaturkontrolle erfolgte im Medium mit einem Alkoholthermometer und die Probenahme über eine Edelstahlkanüle.

Die Abluft wurde durch einen Abluftkühler (Glasrückflusskühler) geleitet, welcher mittels eines Kryostaten auf 2 °C gekühlt wurde. Zwischen dem Fermenterdeckel und dem Glaskörper des Umwurfreaktors wurde in einer dafür vorgesehenen Nut ein Silikondicht-ring eingelegt und der Deckel und Reaktor mit einem Metallspannring luftdicht verschlossen.

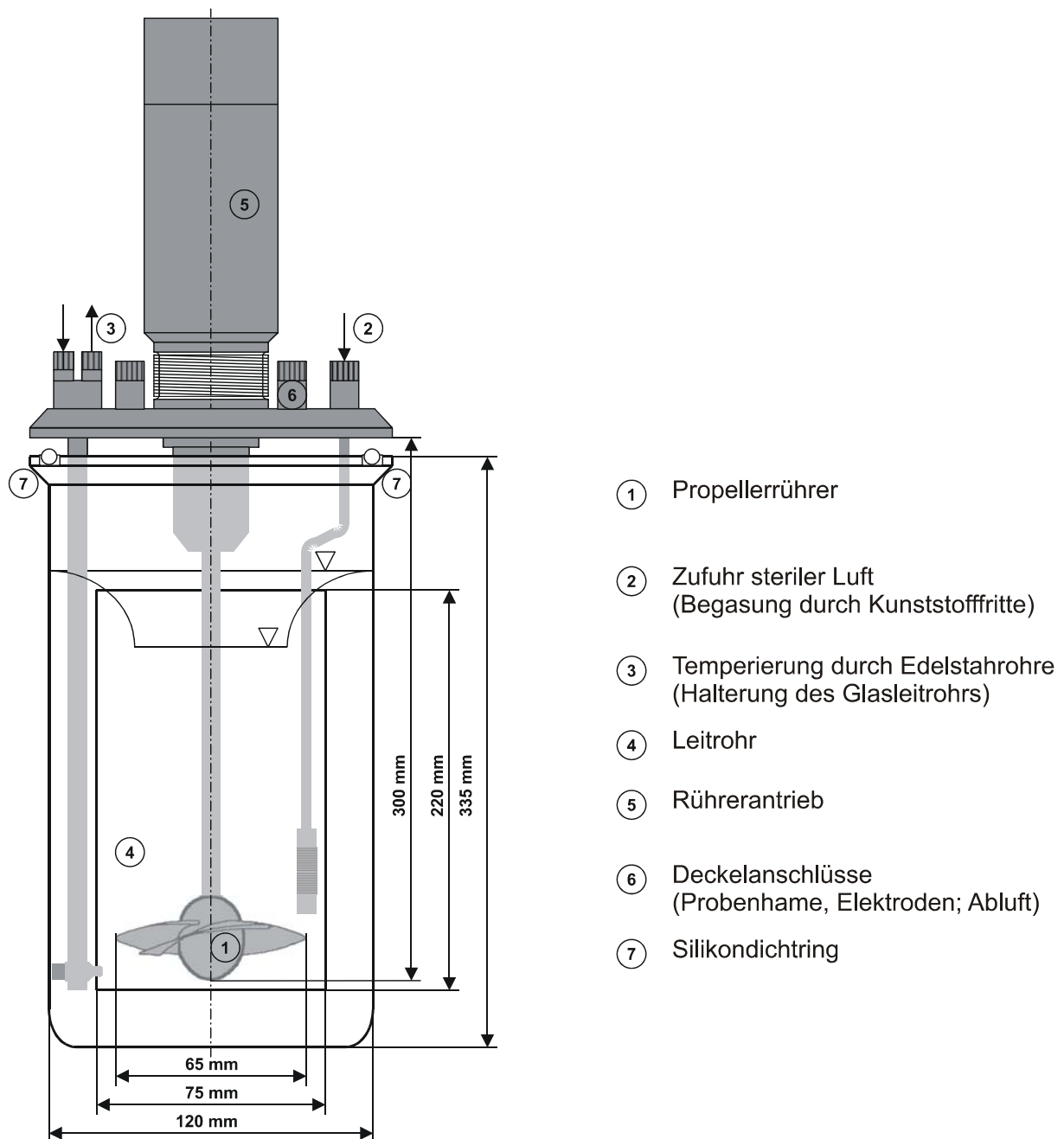


Abbildung 3.2: Reaktoraufbau und Abmessungen des 3 l Umwurfreaktors (Meredos)

Bei diesem Umwurfreaktor erfolgte der Einbau der Einbauten von oben. Um die Strömungsführung durch Einbauten möglichst gering zu halten wurde nur das Thermometer zur Temperaturkontrolle und die Sauerstoffelektrode eingesetzt. Die online Datenerfassung des Sauerstoffpartialdruckes erfolgte durch die Software DaisyLab 6.0. Die Belüftung wurde manuell geregelt. Die Druckluft wurde durch einen Vordruckminderer auf 1 bar begrenzt, der Luftstrom mittels Nadelventil eingestellt und über einen Sterilfilter ($0,22\ \mu\text{m}$) in die Kunststofffritte des Reaktors eingeleitet. Auch hier galt der Richtwert 20 % pO_2 .

Die Belüftungsrate betrug maximal 0,03 vvm.

Die Durchführung erfolgte wie im 1,5 l Rührreaktor (Kapitel 3.1.4.2, Seite 31) mit folgenden Betriebsparametern:

- 2,4 l Arbeitsvolumen, Standardproduktionsmedium (Tabelle 3.1, Seite 29)
- 34 °C, 20 % Sauerstoffsättigung
- 700 Upm Rührerdrehzahl, mit steigender Viskosität auf 730 Upm erhöht
- Start pH 3,1 ungeregelt

3.1.6 Kultivierung von *Aspergillus terreus* im 15 l Rührreaktor

Die Kultivierung im 15 l Rührkesselreaktor Biostat E (Braun, Melsungen, Abbildung 3.3) wurde unter folgenden Betriebsparametern durchgeführt:

- 10 l Arbeitsvolumen, Standardproduktionsmedium (Tabelle 3.1, Seite 29)
- 34 °C, 20 % Sauerstoffsättigung
- 350 Upm Rührerdrehzahl
- Start pH 3,1 ungeregelt

Die pO₂- und Temperaturregelung und die Einstellung der Rührerdrehzahl erfolgte über die zum Reaktor gehörige Schalttechnik. Die Vorbereitung und der Betrieb der Fermentation wurden vergleichbar wie in den 1,5 l Glasrührreaktoren (Kapitel 3.1.4.2, Seite 31) sowie nach Anleitung der Betriebsanweisung durchgeführt. Die online Datenerfassung des Sauerstoffpartialdruckes, der Rührerdrehzahl und der Temperatur erfolgte durch die Software DaisyLab 6.0.

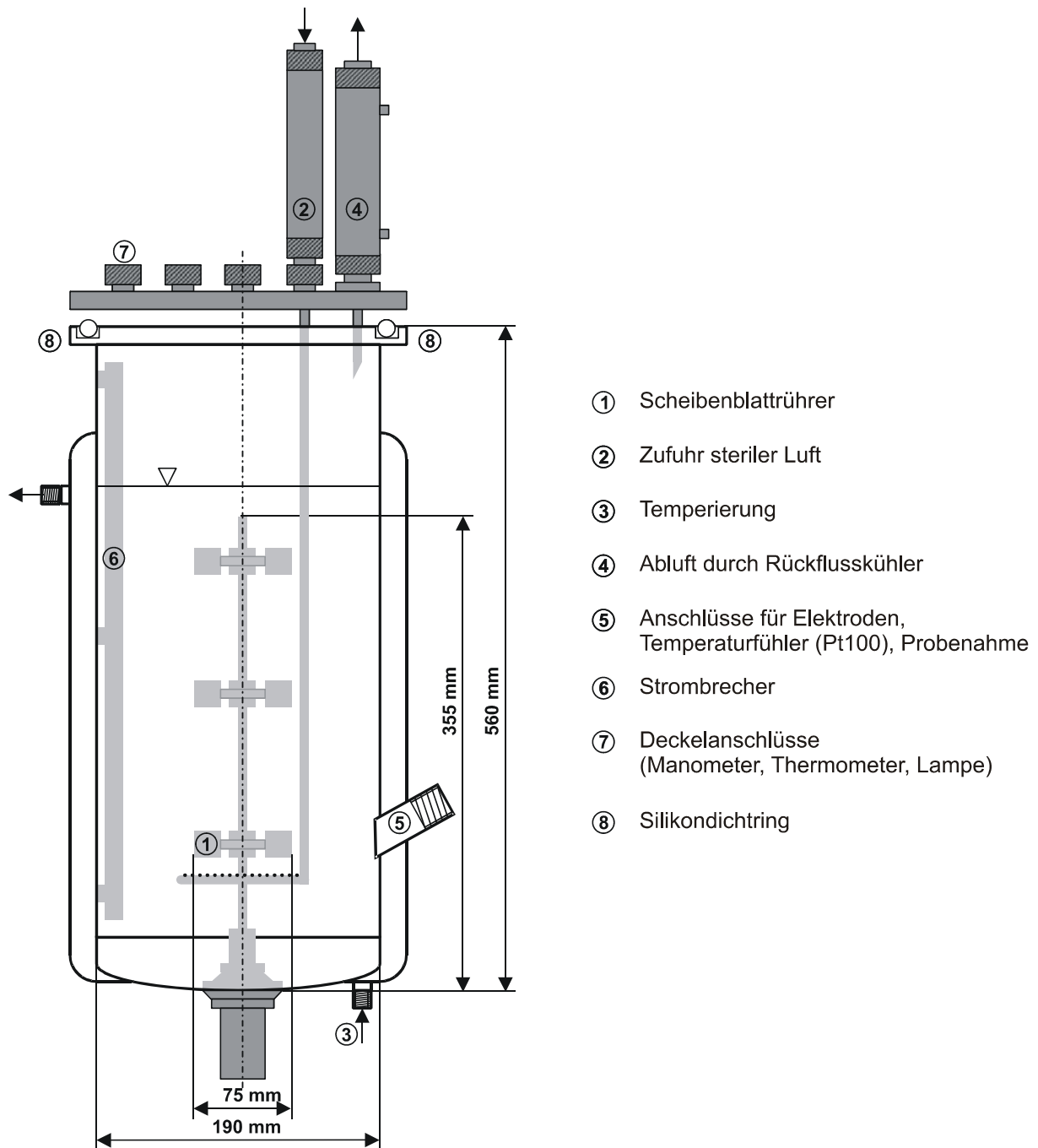


Abbildung 3.3: Reaktoraufbau und Abmessungen des 15 l Rührkesselreaktors (Braun, Biostat E)

Tabelle 3.3: Geräteliste der verschiedenen Reaktoren

Gerät	Modell	Hersteller
Bioreaktor	1,5 l Maßanfertigung	Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden-Lenglern
Vordruckminderer	0-1,5 bar	WIKA, Klingenberg
Nadelventil	0-2 l/min, B-817	Porter Instrument Company Hatfield USA
pO ₂ -Elektrode	PN 5220025	Mettler Toledo, Giessen
pO ₂ -Messgerät	O ₂ -4100	Mettler Toledo, Giessen
pO ₂ -Regler	Low-P-Flow	Bronkhorst HiTech, Ruurlo NL
Rührer	Ikamag REO	IKA-Werte, Staufen
Redoxelektrode	F14805-SC-DPAS-K8S/120	Mettler Toledo, Giessen
Digital pH/mV/ Thermo Meter	GPRT 1400A	Greisinger elektronik, Regenstauf
Thermostat	RM6 + RMS	MGW Lauda Lauda-Königshofen
Kühlaggregat	WK 450	MGW Lauda
Bioreaktor	3 l, axial Rührsystem	Meredos, Noerten- Hardenberg
Reaktorstand	Mess-Regel-Dosiereinrichtung	Meredos, Noerten-Hardenberg
Vordruckminderer	0-2,5 bar	WIKA, Klingenberg
Nadelventil	0-2 l/min, B-817	Porter Instrument Company Hatfield USA
pO ₂ -Elektrode	Ingold 341003046/4357043	Mettler Toledo, Giessen
Thermostat	Ultratemp 2000 + VC	Julabo, Seelbach
Bioreaktor	15 l Biostat E	Braun-Diessel, Melsungen
Reaktorstand	Biostat	Braun-Diessel, Melsungen
Vordruckminderer	0-6 bar	WIKA, Klingenberg
pO ₂ -Elektrode	Ingold 322756701/74581	Mettler Toledo, Giessen
Redoxelektrode	F14805-SC-DPAS-K8S/120	Mettler Toledo, Giessen
pH/mV-Meter	pH 410	WTW, Weilheim

3.2 Analytik

3.2.1 Biotrockenmassenbestimmung

Die Biotrockenmasse (BTM)-Bestimmung erfolgte gravimetrisch (Abbildung 3.4). Die ermittelte Gewichtsdivergenz (Gleichung 3.1) zwischen dem leeren, beschrifteten Reaktionsgefäß und dem mit dem getrockneten Pellet befüllten Reaktionsgefäß ergab die Biotrockenmasse der Probe.

Eine Versuchsreihe zwischen Resuspendieren der Pellets mit Millipore Wasser im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung zeigte, dass bei Einsatz der Kochsalzlösung eine Verschiebung aller Werte, auch der Blindproben² um durchschnittlich +0,88 g/l BTM auftrat. Da unter Verwendung von Reinstwasser keine Verschiebung messbar war, wurden alle weiteren Proben mit Reinstwasser resuspendiert.

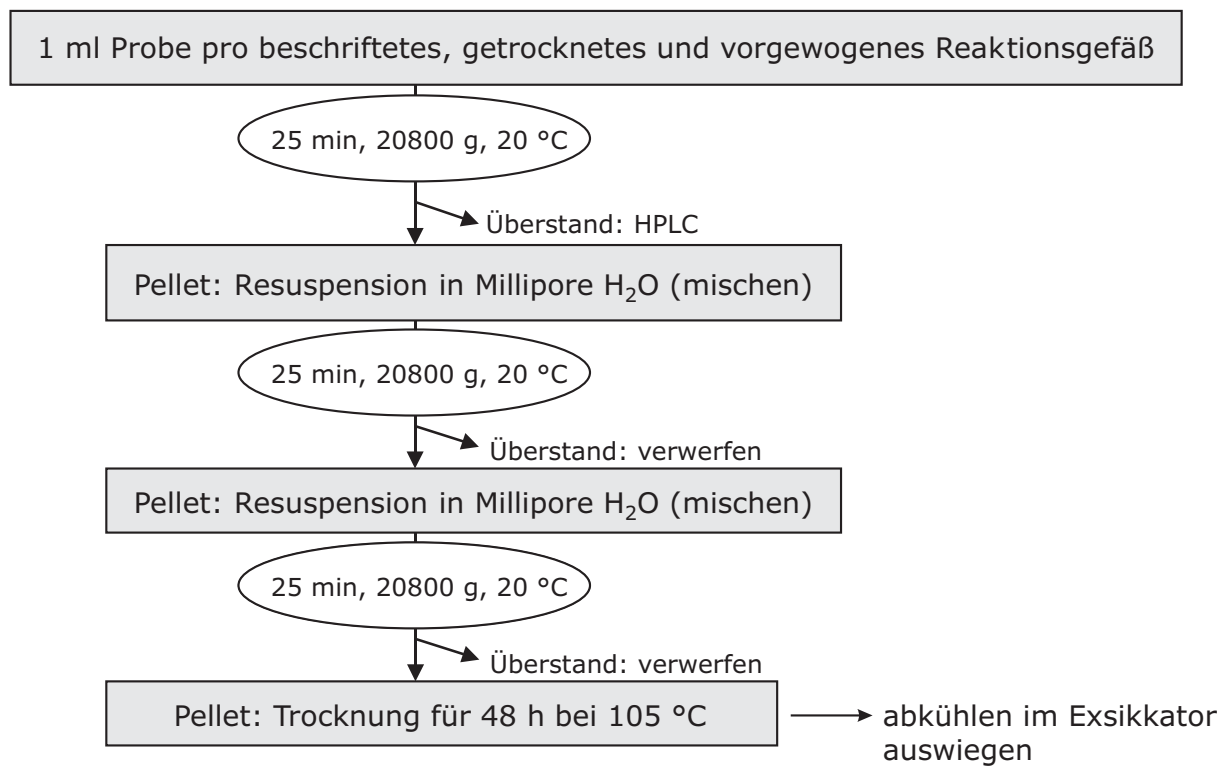


Abbildung 3.4: Gravimetrische Biotrockenmassenbestimmung des filamentösen Pilzes *Aspergillus terreus*

²Anstelle von realen Proben wurden je 1 ml Reinstwasser in die beschrifteten, getrockneten und vorgewogenen Reaktionsgefäße überführt.

$$BTM = \frac{m_{trocken} - m_{leer}}{V} \quad (3.1)$$

mit:

BTM	Biotrockenmasse [g/l]
$m_{trocken}$	Gewicht des Reaktionsgefäßes mit dem getrockneten Pellet [g]
m_{leer}	Gewicht des gleichen leeren Reaktionsgefäßes [g]
V	Volumen der eingesetzten Probe im Reaktionsgefäß [l]

3.2.2 High performance liquid chromatographie

Die High performance liquid chromatographie (HPLC) ist eine Präzisionsmethode zur qualitativen und quantitativen chromatografischen Analyse löslicher Stoffe.

- **Quantitative Analyse der Kohlenhydrate und organischen Säure**

Für die Standardanalyse der Fermentationsproben kam die HPLC (Abbildung 3.5) mit einem UV- und einem Brechungsindex (RI)-Detektor zur Anwendung.

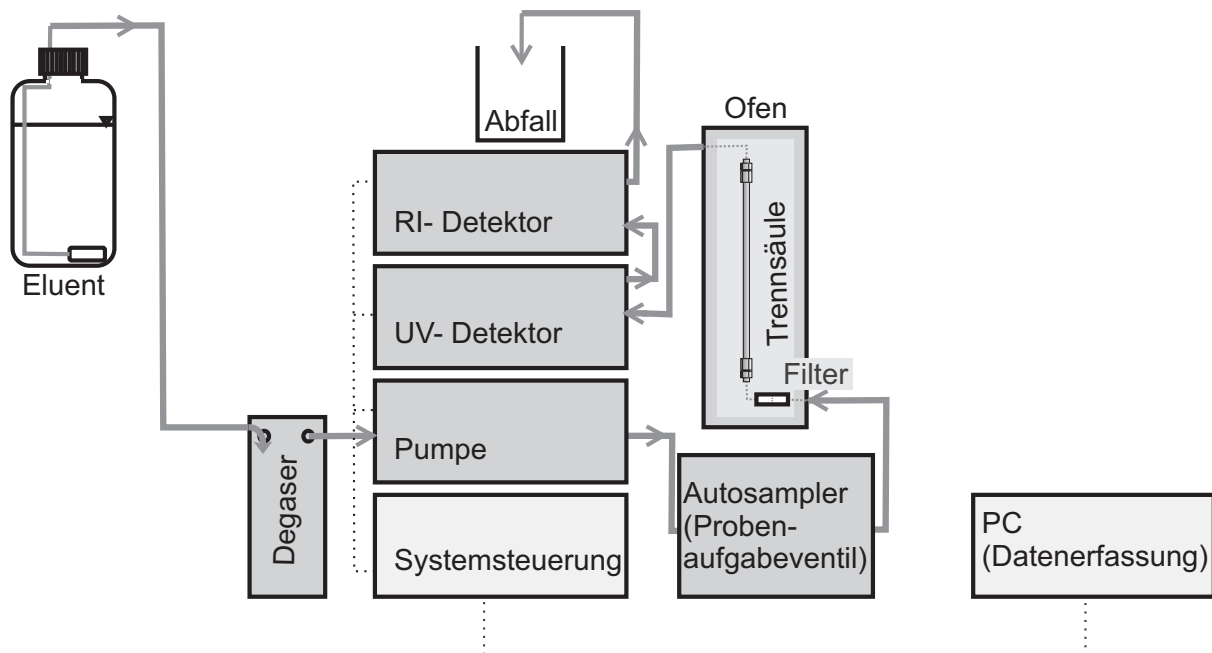


Abbildung 3.5: Schema der HPLC-Anlage

Mit dem UV-Detektor wurde das Hauptprodukt, die Itaconsäure, sowie die Nebenprodukte, organische Säuren des Stoffwechsels, qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Gemessen wurde bei 210 nm, da die Absorption von organischen Säuren mit abnehmender Wellenlänge steigt und die IA bei 210 nm als π -Elektronensystem eine hohe Absorption aufweist.

Mit dem RI-Detektor wurden alle Substanzen die einen anderen Brechnungsindex

als die reine mobile Phase besaßen detektiert und zur Bestimmung der Substrate eingesetzt.

Zur Detektion von Zucker und organischen Säuren wurde die Säule HPX87H (BioRad, München) verwendet. Die Inhaltsstoffe einer Probe wurden auf dieser Säule isokratisch (Laufmittel: 5 mM H_2SO_4), bei 25 °C, um eine Hydrolyse von Saccharose zu vermeiden, durch eine Kombination der Auftrennprinzipien Ionenaustausch-, Ionenausschluss- und Größenausschlusschromatographie separiert.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt digital, über die Peakfläche durch das Computerprogramm LC 10 (Shimadzu Duisburg). Zur genauen Zuordnung und Auswertung der einzelnen Substanzen wurde mit Standardlösungen dieser Substanzen kalibriert.

Zur Vermessung der realen Kulturproben wurde der gewonnene Überstand, aus dem ersten Zentrifugationsschritt siehe Kapitel 3.2.1, sofort entsprechend der erwarteten Produktkonzentration mit Reinstwasser verdünnt (1:100, 1:200 bis 1:400) und bis zur Analyse mittels HPLC bei -20 °C gelagert. Eine Standardmessung dauerte 20 Minuten und wurde mit den in Tabelle 3.4 beschriebenen Geräten und Betriebsparametern durchgeführt.

Tabelle 3.4: Geräteliste der HPLC zur Bestimmung von Zuckern und organischen Säuren

Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule (30 cm)	HPX87H	BioRad, München	$T_{\text{Säule}}$: 25 °C; Flussrate 0,6 ml/min
System Controller	CBM-10AT	Shimadzu, Duisburg	Wellenlänge 210 nm
UV-Detektor	SPD-10A	Shimadzu, Duisburg	
RI-Detektor	RID-6A	Shimadzu, Duisburg	
Pumpe	LC-10 AT	Shimadzu, Duisburg	
Degaser	Gastorr Flow	Japan	Pobenvolumen 20 μl
Datenerfassung	Class LC 10	Shimadzu, Duisburg	
Autosampler	Basic Marathon	Spark, Emmen, Niederlande	

• Quantitative Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Für die Bestimmung der Ammoniumkonzentration wurde die Ionenaustauschchromatographie mit direkter elektrischer Leitfähigkeitsmessung verwendet. Die zellfreien Proben wurden mit 2 mM HNO_3 1:50 verdünnt, um die Ammoniumkonzentration in dem Bereich um 10 mg, der vom Hersteller angegeben wird, einzustellen. Als Eluent wurde 4 mM Weinsäure, 0,75 mM Dipicolinsäure in Reinstwasser verwendet. Die Analysendauer betrug 30 Minuten. Die Analysen wurden mit den in Tabelle 3.5 angegebenen Geräten und Betriebsparametern durchgeführt.

Tabelle 3.5: Geräteliste und Parameter der HPLC zur Bestimmung von Ammonium

Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule (250 * 4 mm)	METROSEP C2 250/4.0	Metrohm, Herisau, Schweiz	T: 30 °C; Flussrate 1 ml/min
Detektor	GAT-WESCAN, Ion Analyzer	Gamma Analysen Technik GmbH, Bremerhaven	Ionenchromatographie- Modul, Probenvo- lumen 20 µl
Pumpe	HPLC-Pump K-501	Knauer GmbH, Berlin	
Degaser	DEGASYS DG- 1300	Uniflows, Tokyo, Ja- pan	
System Controller	CBM-10AT	Shimadzu, Duisburg	
Datenerfassung	Class LC 10	Shimadzu, Duisburg	

- **Quantitative Bestimmung der Nitratkonzentration**

Für die Bestimmung der Nitratkonzentration wurde eine Reversed-Phase HPLC Säule mit UV-Detektion bei 210 nm angewendet. Die zellfreien Proben wurden mit Reinstwasser 1:10 verdünnt. Als Eluent wurde 5 % MeOH, 0,2 % Octylamin in Reinstwasser, pH 6,5 eingestellt mit H_3PO_4 verwendet. Das Octylamin dient als Ionenpaarreagenz und der Phosphatanteil im Laufmittel wirkt als Gegenion-Puffer. Nitrat eluiert unter den angegebenen Bedingungen bei 2,5 Minuten und Itaconsäure bei 15 Minuten. Die Analysen wurden mit den in Tabelle 3.6 angegebenen Geräten und Betriebsparametern durchgeführt.

Tabelle 3.6: Geräteliste und Parameter der HPLC zur Bestimmung von Nitrat

Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule	ODS-Hypersil 120 A 5 µm; 125*4,6 mm	Shandon, England	Raumtemperatur; Flussrate 2 ml/min
UV-Detektor	LKB 2151	LKB-BROMMA, Schweden	210 nm
Pumpe	High Precision Pump 300 C	Gynkotec, München	
Degaser	ERC-3114	ERC, Tokyo, Japan	
System Controller	CBM-10AT	Shimadzu, Duis- burg	
Datenerfassung	Class LC 10	Shimadzu, Duis- burg	
Autosampler	PROMIS	Spark, Emmen, Niederlande	Probenvolumen 20 µl

• Quantitative Bestimmung der Phosphatkonzentration

Für die Bestimmung der Phosphatkonzentration wurde ein Dionex Messsystem mit einem Leitfähigkeitsdetektor verwendet. Das Kultivierungsmedium sowie die erste Probe nach 15 Stunden wurden 1:70, die Proben nach 20 und 40 Stunden Kultivierungsdauer wurden 1:50 und alle weiteren Proben wurden 1:10 mit Reinstwasser verdünnt. Als Eluent wurde 30 mM NaOH eingesetzt. Die Analysen wurden mit den in Tabelle 3.7 angegebenen Geräten und Betriebsparametern durchgeführt.

Tabelle 3.7: Geräteliste und Parameter der HPLC zur Bestimmung von Phosphat

Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule	HS11-HC 4 mm, inkl. Vorsäule	Dionex	T: 30 °C; Flussrate 1 ml/min
Suppressor	AMMS III (4 mm)	Dionex	
Detektor, Pumpe, Degaser	Dionex BIO LC 4000	Dionex Corporation, Austin, USA	
System Controller	CBM-10AT	Shimadzu, Duisburg	
Datenerfassung	Class LC 10	Shimadzu, Duisburg	
Autosampler	Basic Marathon	Spark, Emmen, Niederlande	Pobenvolumen 20 μ l

3.2.3 pH-Wert Messung

Die pH-Wert Messung bei den Kultivierungen im Schüttelkolben und im Fermenter wurde extern durchgeführt. Der abzentrifugierte Überstand (Kapitel 3.2.1, Seite 38) wurde nach der Entnahme eines Aliquots für die HPLC Analytik mittels pH Elektrode vermessen. Die pH Elektrode (InLab Micro, Mettler Toledo Giessen) wurde vorher mit den pH Puffern 7 und 4 kalibriert.

3.2.4 Mikroskopie (Bildanalyse)

Proben der Wachstums- und Produktionsphase wurden mikroskopiert um die Keimung der Sporen sowie die sich ausbildende Morphologie des Pilzes zu untersuchen. Dazu wurden Präparate mit dem Phasenkontrastmikroskop (Axioplan, Fa. ZEISS, Zeiss Oberkochen) 25 und 40fach vergrößert mikroskopiert und mit der Software analySIS (analySIS 5.0, Soft Imaging System GmbH) verarbeitet.

3.2.5 Bestimmung der Sporenkonzentration

Nach der Ernte der Sporen zur Herstellung einer Arbeitskulturs (Kapitel 3.1.1, Seite 28) wurde ein Aliquot entnommen und die Sporenkonzentration dieser Suspension mittels Zählkammer nach *Thoma* bestimmt. Die Zählkammer wurde vor der Benutzung gründlich gereinigt und das Deckglas wurde vorsichtig auf die beiden Trägerstege geschoben. Saß das Deckglas fest (Ausbildung der „Newtonschen Ringe“) wurde ein Tropfen der Sporensuspension an den Deckglasrand pipettiert, so dass sich die Flüssigkeit aufgrund der Kapillarkraft luftblasenfrei zwischen Deckglas und Zählkammer sog. Es wurden im Phasenkontrast mit einer 40fachen Vergrößerung je zwei 4x4 Großquadrate (insgesamt 512 Kleinquadrate) ausgezählt. Die Sporenkonzentration errechnete sich aus der Gleichung 3.2.

$$c_{MO} = \frac{\bar{n} * 10^3}{A * h} \quad (3.2)$$

mit:

c_{MO}	Mikroorganismenkonzentration [ml^{-1}]
\bar{n}	Mittelwert der Mikroorganismenanzahl je Kleinquadrat
A	Fläche eines Kleinquadrates [mm^2]
h	Kammerhöhe [mm]

Bei der verwendeten Zählkammer mit der Tiefe 0,02 mm und der Fläche eines Kleinquadrates von $1/400 \text{ mm}^2$ ergab sich die Gleichung:

$$c_{MO} = \bar{n} * 2 * 10^7 \quad (3.3)$$

3.2.6 Bestimmung der Ausbeute

Die molare Ausbeute der Itaconsäureherstellung errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$Y_{P/S} = \frac{c_{IA_t}}{c_{S_0} - c_{S_t}} * \frac{M_S}{M_{IA}} * 100 \quad (3.4)$$

mit:

$Y_{P/S}$	molare Ausbeute [% (mol/mol)]
c_{IA_t}	Konzentration der gebildeten IA zum Zeitpunkt t [g/l]
c_{S_0}	Ausgangssubstratkonzentration [g/l]
c_{S_t}	Konzentration des Substrates zum Zeitpunkt t [g/l]
M_S	Molmasse des Substrates [g/mol]
M_{IA}	Molmasse der IA [g/mol]

Wird Glucose als Substrat eingesetzt, wird 1 mol Glucose (180 g/mol) zu 1 mol IA (130 g/mol) umgesetzt. Theoretisch kann somit 72 % der eingesetzten Glucose zu IA umgesetzt werden. Dieses molare Verhältnis wird bei der Berechnung der Ausbeute (Gleichung 3.4) mit einbezogen. Eine molare Ausbeute $Y_{P/S}$ von 100 % würde bedeuten, dass

die theoretisch möglichen 72 % der eingesetzten Glucose vollständig zu IA umgesetzt wurden.

3.3 Produktaufarbeitung

Im folgenden Kapitel werden die Versuchsdurchführungen sowie die Methoden und Materialien der Produktaufarbeitung der IA mittels Elektrodialyse, Flüssig/Flüssig-Extraktion sowie Kristallisation beschrieben.

3.3.1 Elektrodialyse

3.3.1.1 Versuchsaufbau

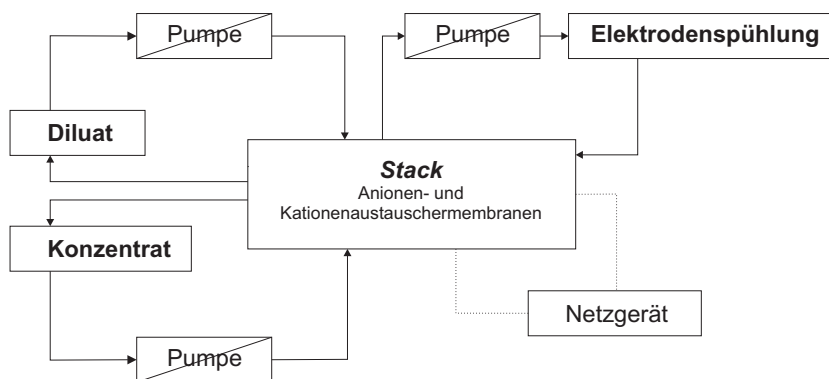


Abbildung 3.6: Schema der Elektrodialyseanlage

Der Versuchsaufbau (chematisch: Abbildung 3.6, fotografisch: Abbildung 3.7) der Elektrodialyse (ED) gliederte sich in das ED-Modul (Stack) bestehend aus 6 Kationen- und 5 Anionenaustauschermembranen und die Vorlagebehälter (5 l) für das Diluat, Konzentrat und die Elektroden-spüllösung. Die Versuche wurden in der batch-Verfahrensweise bei konstanter Spannung, betrieben. Alle Lösungen wurden im Kreislauf geführt. An den Zulaufschläuchen für die Diluat- und Konzentrat- Vorlagebehälter wurden Probenahmestellen montiert. Proben konnten durch die in den Flüssigkeitsstrom hineinragenden Kanülen mittels Einwegspritzen entnommen werden.

3.3.1.2 Durchführung

Der Diluat- und der Konzentratkreislauf wurde vor Versuchsbeginn 10 Minuten mit 5 μ S Wasser mindestens zweimal gespült. Die Elektroden-spüllösung (0,5 mol/l H_2SO_4) wurde bei Verunreinigungen erneuert. Die aufzureinigende Flüssigkeit wurde im Diluatvorlagebehälter und das entsprechende Volumen an 5 μ S Wasser im Konzentratvorlagebehälter vorgelegt. Vor Versuchsbeginn wurde das Gewicht, der pH-Wert und die Temperatur des

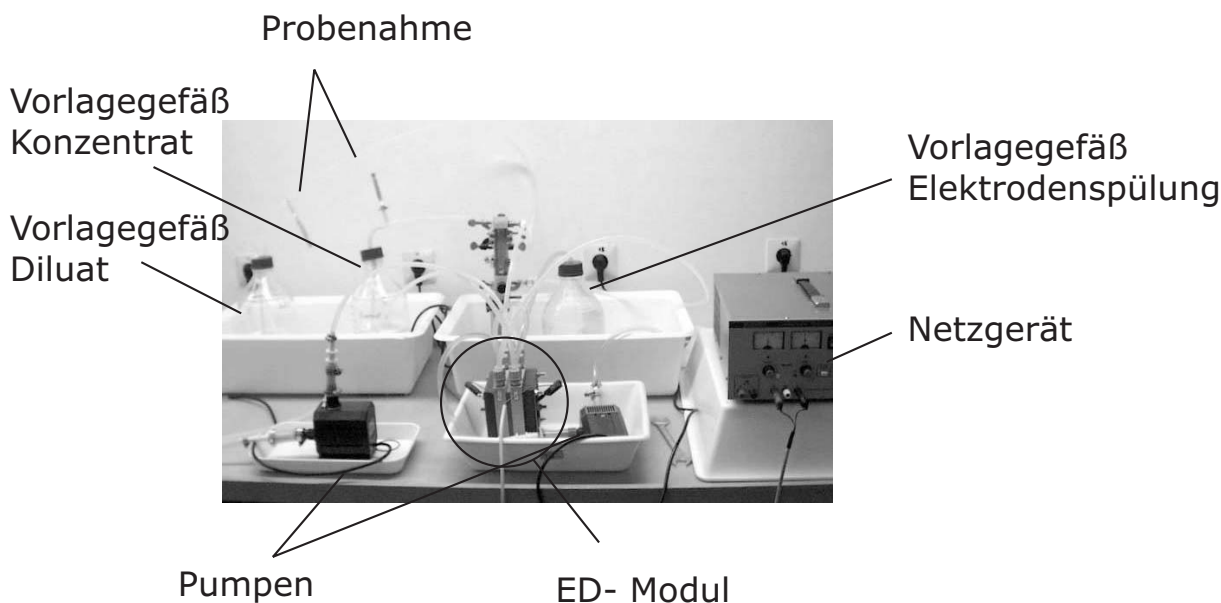


Abbildung 3.7: Aufbau der Elektrodialyseanlage

Diluates und des Konzentrates bestimmt.

Bei einer Elektrodialyse wurden folgende Proben (je 1 ml) genommen:

- Nullprobe des Diluates und des Konzentrates vor dem Befüllen der Vorlagebehälter
- Nullprobe der Lösungen im System, nachdem die Kreisläufe ohne elektrischen Strom mindestens 5 Minuten im Kreis gepumpt wurden
- nach dem Start der Elektrodialyse, alle 10 Minuten an den Probenahmestellen der Zulaufschläuche

Die ED wurde gestartet, indem die Spannung am Netzgerät auf $U=15\text{ V}$ (konstant) eingestellt und das Netzgerät eingeschaltet wurde. Zeitgleich mit den Probenahmen (alle 10 Minuten nach Versuchsstart) wurde die momentane Stromstärke, die Volumenabnahme des Diluates (gravimetrisch), der pH-Wert und die Temperatur dokumentiert. Wurde die Anfangsstromstärke (niedrigster Wert) wieder erreicht, erfolgte der Abbruch des Versuches indem das Netzgerät ausgeschaltet wurde.

Der Diluat- und der Konzentratkreislauf wurden mehrfach mit $5\text{ }\mu\text{S}$ Wasser gespült und die ED-Anlage wurde gefüllt mit $5\text{ }\mu\text{S}$ Wasser bei Raumtemperatur gelagert.

Die Probencharge wurde entsprechend der erwarteten IA Konzentration verdünnt und mittels HPLC analysiert (siehe Kapitel 3.2.2, Seite 39).

Folgende ED-Versuche wurden durchgeführt:

- **Bestimmung der Grenzstromdichte**

Die Bestimmung der Grenzstromdichte erfolgte nach Cowen und Brown. Bei der Durchführung der Elektrodialyse wurde unter konstanter Zulaufkonzentration im

Diluat und Konzentrat die elektrische Spannung langsam gesteigert und die resultierende Stromstärke notiert (Cowan and Brown, 1959) (Rapp, 1995).

Um die Konzentration in Diluat und Konzentrat (80 g/l IA, Konzentration der in etwa erwarteten Diluatkonzentration in realen Versuchen) trotz Ionenwanderung annähernd konstant zu halten, wurden die Anschlüsse von Diluat- und Konzentratausgang am Membranstapel vertauscht. Die Spannung wurde von 0-30 V in 2 V Schritten erhöht. Der Strom I, der sich bei der jeweiligen Spannung einstellte, wurde am Netzgerät abgelesen. Die aufgenommenen Wertepaare wurden in Diagrammform ($R = f(I^{-1})$) dargestellt.

• Modelllösungen

Die Elektrodialyse wurde mit verschiedenen Modelllösungen durchgeführt, um die Trennleistung dieser ED-Anlage bei verschiedenen IA:Glucose Verhältnissen (g:g) zu untersuchen. Die Volumina des Diluates und des Konzentrates betrugen je 1 l. Folgende Verhältnisse wurden eingesetzt:

Modelllösungen (IA:Glc): 3:1; 5:1; 7:1; 9:1

• reale Kulturbrühe

Bei der Elektrodialyse realer Kulturbrühen (Tabelle 3.8) wurde vor der ED die Biomasse abzentrifugiert (30 Minuten, 6500 g), um Bewuchs und Ablagerungen von Partikeln in den Poren der Membranen zu vermeiden. Die IA Konzentrationen des Diluates (reale Kulturbrühe) lagen zwischen 60 und 80 g/l.

Tabelle 3.8: Versuchsbezeichnung und eingesetztes Volumen der Elektrodialyse Versuche mit realer Kulturbrühe

eingesetztes Diluat Volumen	Versuchsbezeichnung
1 l	K1
0,5 l	K2; K3
0,8 l	K4 (Aufkonzentrierung)

Bei dem Versuch K4 wurde untersucht, ob eine Aufkonzentrierung der IA im Konzentratkreislauf möglich ist. Dazu wurden 0,8 l Diluat (Kulturbrühe), aber nur 0,4 l 5 μ S Wasser im Konzentratkreislauf vorgelegt.

Tabelle 3.9: Geräteliste für den Elektrodialyse Prozess

Gerät	Typ	Hersteller
Netzgerät	LP53303 A; 0-30 V, 0-3 A	Angewandte System Technik, Wolnzach
Pumpe	1048; 10 W, 10 l/min, IP68	EHEIM, Deizisau
Pumpe(Diluat)	UP 2000/1; 38 W, 2000 l/h, IP68;	AquaBee, Heidenheim
ED-Stack	PC Cell ED 1; aktive Membranfläche 58 cm ²	PCA-GmbH, Heusweiler
Membranen	PC 400 D pH-Bereich: 0-10	PCA GmbH, Heusweiler
Waage	I6800-D2, max. 6860 g	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge	Hermle ZK 630 BHG	HERMLE GmbH, Gosheim

3.3.2 Flüssig/Flüssig-Extraktion

3.3.2.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau (Abbildung 3.8) besteht aus einem 150 ml Glasreaktionsgefäß, welches über einen Doppelmantel mittels eines externen Thermostaten temperierbar ist, Ansatzstutzen für den Zu- bzw. Abfluss der organischen und wässrigen Phase sowie einem darin montierbaren Rührer.

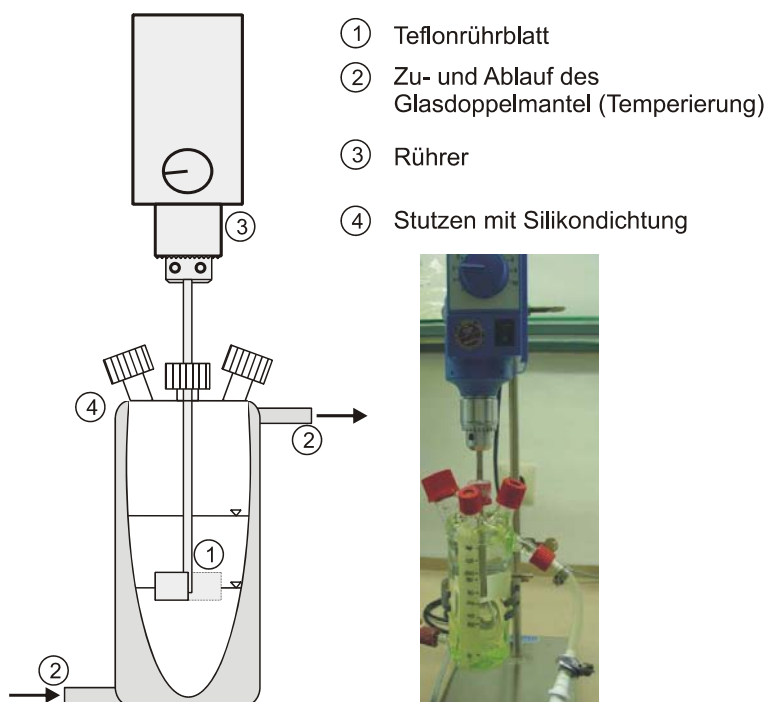


Abbildung 3.8: Aufbau der Extraktionsanlage

3.3.2.2 Durchführung der Reaktivextraktion

Als organische Phase wurden 1-Butanol, 1-Octanol und Decanol (Lösungsmittel) sowie Trioctylamin (Reaktivkomponente) eingesetzt, untersucht und optimiert. Für die Optimierung der Reaktivextraktion wurde eine Modelllösung bestehend aus Itaconsäure und Glucose eingesetzt. Das optimierte System wurde anschließend in realen Kulturbrühen mit und ohne Biomasse eingesetzt.

Die Verfahrensweise bei der Reaktivextraktion von Itaconsäure ist in der Abbildung 3.9 dargestellt.

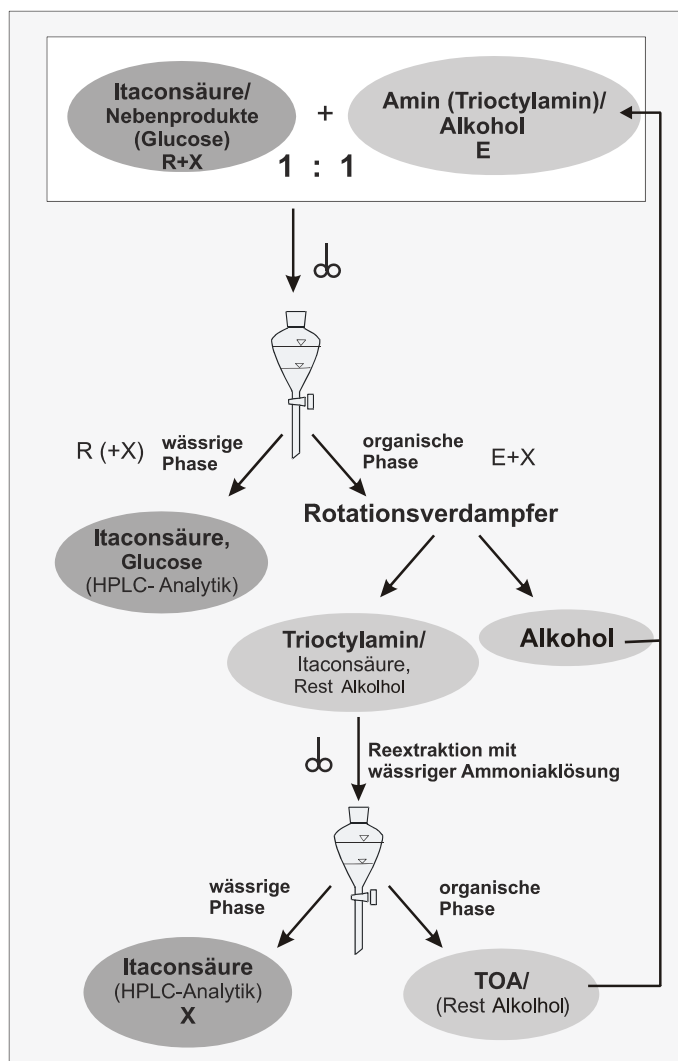


Abbildung 3.9: Fließschema der Durchführung des Extraktionsprozesses

Die organische (E) und wässrige Phase (R+X) wurden separat eingewogen und in das vortemperierte Reaktionsgefäß überführt. Der Rührer mit Teflonrührblatt wurde so montiert, dass sich das Rührerblatt in der Phasengrenze befand. Im Anschluss an die Durchmischung (460 Upm) wurde die erzeugte Suspension in einen Scheidetrichter überführt, in dem die Koaleszenz und Trennung der Phasen erfolgte. Zur Dokumentation des Extrak-

tionserfolgs wurde die Veränderung der Konzentration der Itaconsäure in den wässrigen Phasen analysiert. Dafür wurde eine Probe der wässrigen Phase vor und nach der Reaktivextraktion zur Itaconsäurebestimmung mittels HPLC (Kapitel 3.2.2, Seite 39) analysiert.

Die Reaktivextraktion der Itaconsäure aus der wässrigen Phase (R+X) wurde durch folgende Versuche optimiert:

- Optimierung der Extraktion (Reaktivkomponente + Lösungsmittel):
 - Variation des MOLAREN AMIN-SÄURE-VERHÄLTNISSES [mol/mol]:
 $\nu_M = 0,3; 0,7; 1,0; 1,2; 1,4$
 - Variation des AMIN-ALKOHOL-MASSENVERHÄLTNISSES [g/g]:
 $\nu_m = 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6$
- Extraktionstemperatur: $T [^{\circ}\text{C}] = 25; 30; 35; 40$
- Bestimmung der Übergangszeit für IA (X): $t = 5 \text{ s}-20 \text{ min}$
- Einsatz des optimierten Systems bei Kulturbrühen:
 - Kulturüberstand (ohne Biomasse)
 - Fermentationsbrühe (mit Biomasse)

3.3.2.3 Durchführung der Reextraktion von Itaconsäure

Die Reextraktion, Extraktion der Itaconsäure aus der organischen Phase in eine wässrige Phase, wurde durch folgende Versuche untersucht:

- Wirkung der Ammoniakkonzentration: $c_{\text{NH}_3} [\text{g/l}] = 10; 20; 30; 40; 50; 80$
- Temperatureinfluss: $T [^{\circ}\text{C}] = 25; 35; 50; 65$
- Einengung der organischen Phase mit anschließender Reextraktion:

Mittels Rotationsverdampfer wurde das Volumen der organischen Phase von ca. 80 ml auf 20 ml verringert. Um ein vorzeitiges Ausfallen der Itaconsäure zu verhindern, wurde das 1-Butanol nicht vollständig abgezogen.

1. Reextraktion mit 10 ml Wasser und 24 Stunden Mischzeit.
2. Der Zusatz einer wässrigen Ammoniaklösung zur wässrigen Phase (gesamt: 20 ml H_2O + 5 ml wässr. Ammoniaklösung (25 %), $c_{\text{NH}_3} = 50 \text{ g/l}$, bewirkte eine Verschiebung des pH-Wertes von 7,5 auf ca. 10. Die Phasentrennung im Scheidetrichter erfolgte sehr schnell. Theoretisch konnte bei diesem Versuch erwartet werden, dass nach 24 Stunden Mischzeit in der wässrigen Phase eine Konzentration von ca. 100 g/l Itaconsäure vorlag.

Tabelle 3.10: Geräteliste der Reaktivextraktion

Gerät	Typ	Hersteller
Rührer	RW 20.h	IKA Labortechnik, Malaysia
Thermostat	Ultratemp 2000	Julabo F30, Seelbach
Waage	FTB 3 KO.1	Kern & Sohn

3.3.3 Kristallisation

Die Biomasse wurde durch Zentrifugation (30 Minuten, 6500 g) von der Kulturbrühe abgetrennt. Der zellfreie Kulturüberstand wurde dem Flieschema (Abbildung 3.10) entsprechend weiter verwendet. Die Versuche zur Kristallisation durch Abkühlung variierten

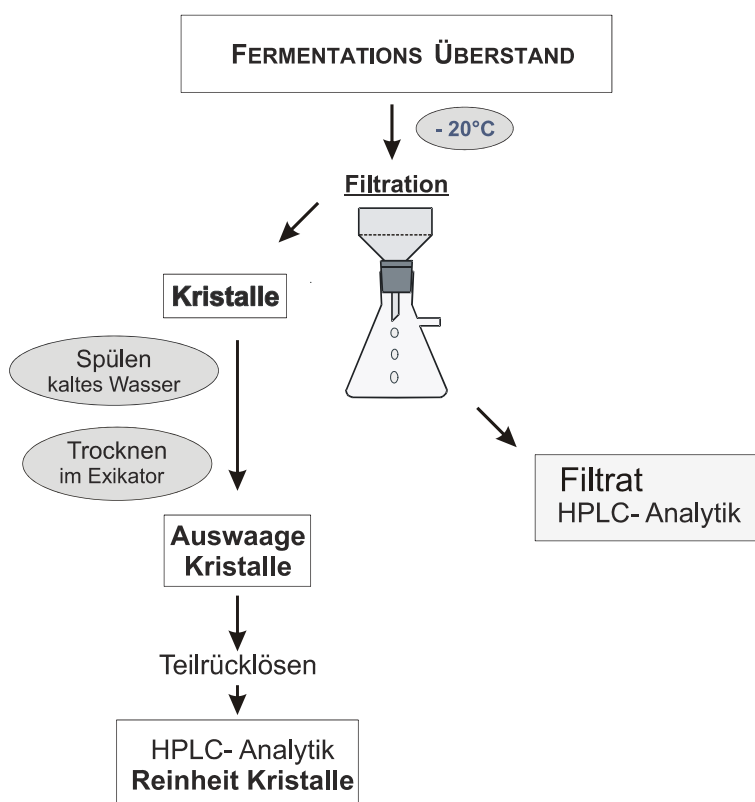


Abbildung 3.10: Fließschema der Kristallisation

in der Dauer und Intensität der Kühlung. Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- 4 °C: UK 1 und UK 4
- -20 °C: UK 2 / UK 3 als Doppelansatz

Bei der Abkühlung der Kulturüberstände auf 4 und -20 °C trat Kristallbildung auf. Mittels Vakuumfiltration (Wasserstrahlpumpe) wurde dieser auskristallisierte Feststoff

von der Flüssigkeit abfiltriert (Papierfilter). Die Kristalle wurden mit kaltem Wasser (4 °C) gespült und anschließend auf dem Filter in einer zuvor ausgewogenen Petrischale im Exsikkator getrocknet. Das Gewicht der Kristalle wurde bestimmt und anschließend eine Teilmenge der Kristalle in Reinstwasser rückgelöst. Die Itaconsäure Konzentration wurde durch die HPLC-Analyse (Kapitel 3.2.2, Seite 39) ermittelt.

Tabelle 3.11: Geräteliste der Kristallisation

Gerät	Typ	Hersteller
Saugflasche mit seitlicher Olive	Duran 50, Erlenmeyerform	Schott-Mainz, Roth, Karlsruhe
Büchnertrichter Porzellan	Typ KER 110	Roth, Karlsruhe
Konischer Guko-Ring	Naturkautschuk	Roth, Karlsruhe
MilliQplus	Millipore 185	Molsheim, Frankreich
Papierrundfilter	Rotband Rundfilter $\varnothing 110$ mm; 5895 mittlere Porengröße	Schleicher & Schüll, Dassel
Flaschen	Nalgen	VWR, Darmstadt
Zentrifuge	Hermle ZK 630 BHG	HERMLE-GmbH, Gosheim

3.4 Chemikalienliste

Tabelle 3.12: Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller	Qualität
KH_2PO_4	Merck	zur Analyse, $\geq 99,5 \%$
NH_4NO_3	Fluka	zur Analyse, $\geq 99 \%$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck	reinst, $\geq 99 \%$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	zur Analyse, 99102 %
FeCl_3	Merck	zur Synthese, wasserfrei
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Riedel de Häen	rein, 98 %
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck	zur Analyse
NaCl	Merck	krist. Reinst, 99,5 %
Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth	für die Mikrobiologie
D(+) Xylose	Fluka	98 %
Glycerin	Carl Roth	99,5 %
Czapek-Dox Agar	Merck	für die Mikrobiologie
Ucolup N-115	Brenntag, Mühlheim/Ruhr	
Itaconsäure	Fluka	reinst, $\geq 99 \%$
cis-Aconitsäure	Sigma Aldrich	98 %
trans-Aconitsäure	Fluka	99 %
H_2SO_4	Riedel de Häen	zur Analyse
HNO_3	Merck	zur Analyse
Weinsäure D(-)	Carl Roth	zur Analyse
Dipicolinsäure	Fluka	zur Analyse, $\geq 99,5 \%$
Methanol (CH_3OH)	Carl Roth	HPLC Grade
Octylamin	Merck	98%ig in Wasser
H_3PO_4	Riedel de Häen	85%ig in Wasser
Trioctylamin ($\text{C}_{24}\text{H}_{51}\text{N}$)	Fluka	reinst, $\geq 99 \%$
1-Butanol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)	Carl Roth	zur Analyse, $\geq 99,5 \%$
1-Octanol ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$)	Sigma Aldrich	HPLC Grade, 99 %
1-Decanol ($\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}$)	Riedel de Häen	98 %
Ethanol (70 %)	Carl Roth	96 %, vergällt
Ammoniaklösung	Fluka	25 %

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Wachstum und IA-Produktion im Schüttelkolben

Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine Vorauswahl an Itaconsäure produzierenden *Aspergillus terreus* Stämmen getroffen. Näher untersucht wurden die Stämme *Aspergillus terreus* NRRL 1960¹, 1963² sowie der an der FAL gescreente Stamm *A. terreus* LU02b³.

4.1.1 Vergleich der IA produzierenden Stämme *Aspergillus terreus* NRRL 1960, 1963 und LU02b

Die *Aspergillus terreus* Stämme NRRL 1960, 1963 und LU02b wurden parallel unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Unabhängig von dem eingesetzten Stamm beginnt die Keimung der Sporen innerhalb der ersten 24 Stunden. Die exponentielle Wachstumsphase ist nach 2 Tagen abgeschlossen und der pH-Wert der Kulturbrühe auf ~ 2 gesenkt. Zu Beginn der Kultivierung waren 115 g/l Glucose im Medium vorhanden, von denen nach 17 Tagen Kultivierung durchschnittlich noch 45 g/l nachgewiesen werden konnten. Der Pilz beginnt nach 24 h mit der Produktion von Itaconsäure (Abbildung 4.1). Nach 17 Tagen wurden Endkonzentrationen von ungefähr 35 g/l Itaconsäure gemessen. Die verschiedenen Stämme zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf der IA-Produktion. Die Biotrockenmassen (~ 5 g/l) sowie der Glucoseverbrauch war über 17 Tage hinweg ebenfalls bei den drei Stämmen sehr ähnlich.

Somit sind unter den jetzigen Bedingungen, im Vergleich zur Literatur (Tabelle 2.3, Seite 15), nicht der Stamm, sondern andere Faktoren für die schlechten IA-Produktionen

¹*A. terreus* NRRL 1960 wird in der Literatur für intensive Studien zur IA-Produktion eingesetzt (Roehr et al., 1992).

²*A. terreus* NRRL 1963 wurde in der an der FAL durchgeführten Dissertation unter den dortigen Bedingungen als vielversprechender Stamm ausgewählt und untersucht (Welter, 2000).

³*A. terreus* LU02b ist ein IA produzierender Stamm, der aus einer Bodenprobe isoliert wurde (Jahnz et al., 2003).

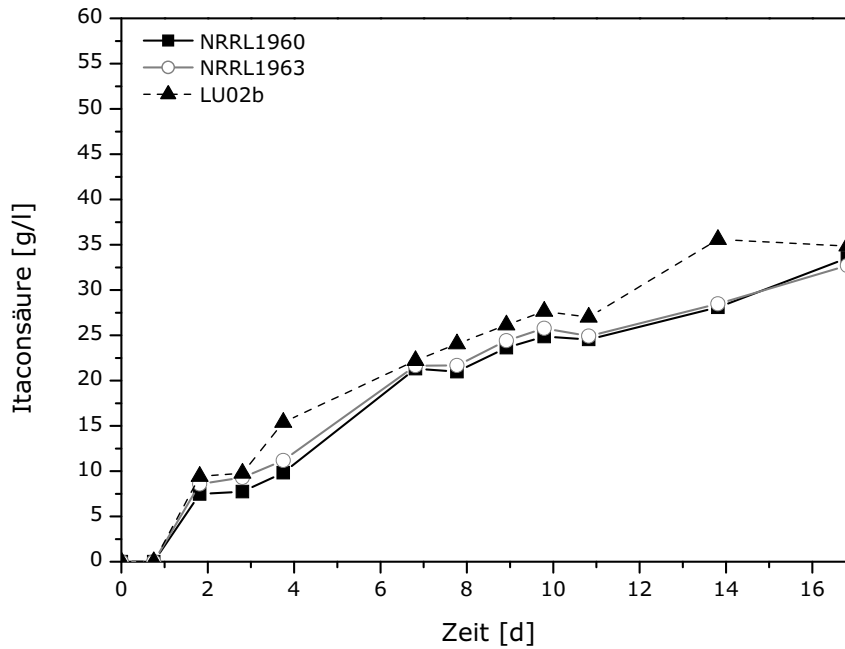


Abbildung 4.1: Itaconsäure Produktion verschiedener *Aspergillus terreus* Stämme in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 unregelt, 120 Upm

entscheidend. Aus diesem Grund wurde nicht nach neuen Itaconsäure produzierenden Stämmen gescreent, sondern zur Effizienzsteigerung der IA-Produktion folgende Faktoren näher untersucht:

- Handhabung während der Kultivierung
- Temperatur
- Substratlimitierung/ Phosphatlimitierung/ Stickstofflimitierung
- Sporenlagerung

Da zwischen den Stämmen kein signifikanter Unterschied beobachtet wurde, wurden alle weiteren Kultivierungen mit dem an der FAL gescreenten Stamm *A. terreus* LU02b durchgeführt, der bereits nach 14 Tagen 35 g/l IA produziert hat.

4.1.2 Einfluss verschiedener Parameter auf die Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b

4.1.2.1 Handhabung während der Kultivierung

Während der Kultivierung der verschiedenen *A. terreus* Stämme (Abbildung 4.1) war die Morphologie nicht einheitlich. Es war ein Gemisch aus freiem Myzel und kleinen dunkleren Pellets (orange-braun). Dies deutet darauf hin, dass der Pilz nicht unter optimalen

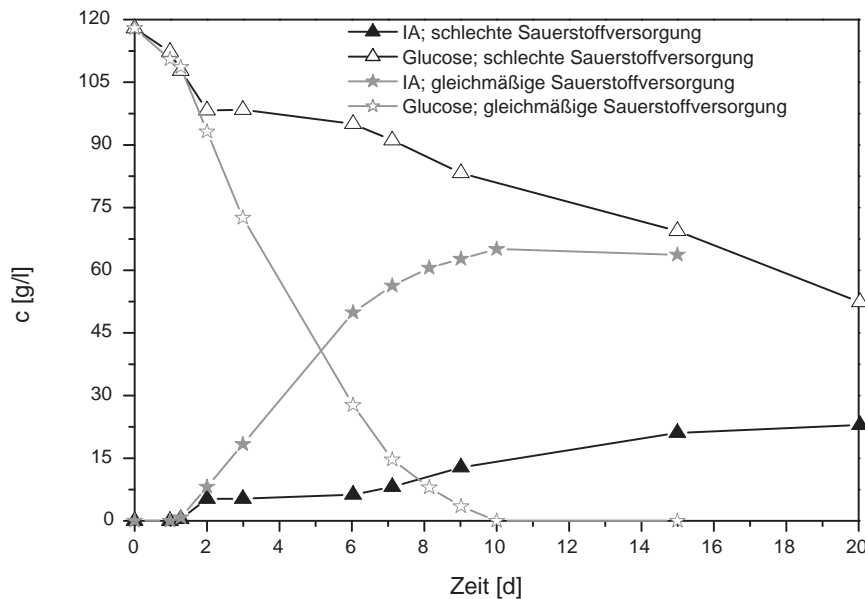


Abbildung 4.2: Neue Handhabung (gleichmäßige Sauerstoffversorgung) im Vergleich zu 10 Minuten nicht schütteln vor jeder Probenahme (schlechte Sauerstoffversorgung); Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 unregelt, 120 Upm

Bedingungen kultiviert wurde, so dass sich Myzel teilweise zu Pellets mit einem Durchmesser von bis zu 4 mm zusammen lagern. Bei den Probenahmen wurden alle Kolben zusammen aus dem Schüttler heraus genommen und nacheinander bearbeitet, wodurch sich die Zeiten des nicht Schüttelns pro Kolben auf ungefähr 10 Minuten summierten. Vermutlich wird der Pilz durch zu häufige Probenahme, oder aufgrund der langen Zeiten des nicht Schüttelns während der gesamten Probenahme nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt.

Um zu überprüfen ob die Probenahme die Ursache für die schlechte IA-Produktion und die Ausbildung der verschiedenen Morphologie Formen darstellt, wurden Kolben während der Probenahme immer per Hand geschüttelt (gleichmäßige Sauerstoffversorgung) und vergleichend zu diesen wurden Kolben vor jeder Probenahme 10 Minuten nicht geschüttelt (schlechte Sauerstoffversorgung) (Abbildung 4.2). Im Verlauf der IA-Produktion wird unter Sauerstoffmangel (schlechte Sauerstoffversorgung) kaum weitere IA gebildet noch Glucose verbraucht. Die Schädigung scheint irreversibel zu sein, da auch im weiteren Verlauf die Produktivität einer guten Sauerstoffversorgung nicht wieder erreicht wird.

Die Morphologie des Pilzes (Abbildung 4.3) ist bei Sauerstoffmangel nicht einheitlich. Wie in Abbildung 4.3 a.) zu erkennen, wächst er in Pellet- und freier Myzelform, vergleichbar mit der Kultivierung der verschiedenen *A. terreus* Stämme (Abbildung 4.1). Wohingegen der Pilz bei guter Sauerstoffversorgung (Abbildung 4.3 b.)) ausschließlich als feines, freies Myzel wächst. Die dunklen Pellets bei der schlechten Sauerstoffversorgung weisen auf eine limitierte Nährstoff- und Sauerstoffversorgung im Pelletinneren hin. Da folglich aktives Myzel zur Produktion von IA fehlt, ist die Produktion deutlich geringer im Vergleich zu

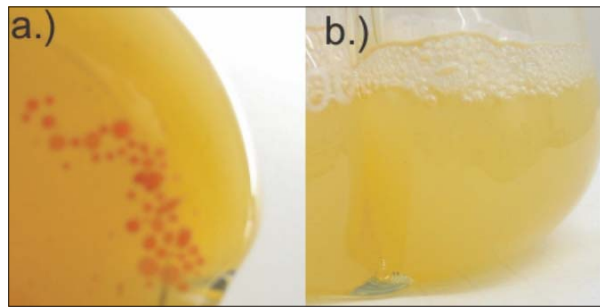


Abbildung 4.3: Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm a.) schlechte Sauerstoffversorgung; b.) gleichmäßige Sauerstoffversorgung

der Kultivierung mit einer gleichmäßigen Sauerstoffversorgung. Nach 10 Tagen Kultivierungsdauer konnten 118 g/l Glucose vollständig verbraucht und 65 g/l IA gebildet werden (76,2 mol% Ausbeute). Bei schlechter Sauerstoffversorgung wurden hingegen lediglich 23 g/l IA nach 20 Tagen produziert.

Dies zeigt, dass Unterbrechungen der Sauerstoffversorgung sich unmittelbar auf die IA-Produktion auswirken. Folglich scheint es für die IA-Produktion wesentlich zu sein, dass der Pilz während der Produktionsphase ausreichend, aber vor allem kontinuierlich mit Sauerstoff versorgt wird. Dies klingt trivial, ist es aber nicht, da jede auch noch so geringe Unterbrechung des Schüttlers (zum Beispiel bei der Probenahme) Auswirkungen hat.

Der Sauerstoffeintrag spielt eine wesentliche Rolle bei der IA-Produktion mit *A. terreus*. Sauerstoff wird benötigt um die Versorgung mit ATP sicherzustellen. Zum einen muss der pH-Wert innerhalb der Zellen auf pH 6,0-7,0 gehalten werden, da die cytoplasmatischen Enzyme dort ihr Optimum besitzen, gegen einen äußeren pH-Wert von 2,0 (Gyamerah, 1995b). Außerdem muss die IA, die im Cytoplasma hergestellt wird, gegen einen Konzentrationsgradienten nach außen ins Medium abgegeben werden. Da diese beiden Prozesse energieabhängig sind, wäre die Sensitivität gegenüber dem Fehlen von Sauerstoff erklärbar.

Gyamerah zeigte, dass nach Unterbrechungen der Sauerstoffzufuhr von 5 bzw. 10 Minuten die IA-Produktion von *A. terreus* NRRL 1960 abbricht und die Produktion erst langsam nach 24 h wieder einsetzt (Gyamerah, 1995b). Nach Lockwood benötigt die IA Fermentation eine durchgehende Belüftung. Eine kurze Unterbrechung der Luftzufuhr wäre ausreichend um die Fermentation zu stoppen (Lockwood, 1975). Der durchgeführte Versuch (Abbildung 4.2) zeigt, dass die Untersuchungen von Gyamerah auch für den an der FAL gescreente Stamm *A. terreus* LU02b gelten. Somit muss für die weiteren Kultivierungen eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet werden.

Bei guter Sauerstoffversorgung⁴ wird eine reproduzierbare IA-Produktion erreicht, die für weitere Optimierungen als Referenz dient. So wird es erstmals möglich, unter reproduzierbaren Bedingungen gezielte Prozessoptimierungen (Medium, Physikalische Parameter) durchzuführen.

⁴Jeder Kolben muss für die Probenahme einzeln dem Schüttler entnommen und per Hand weiter geschüttelt werden, um die Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr zu minimieren

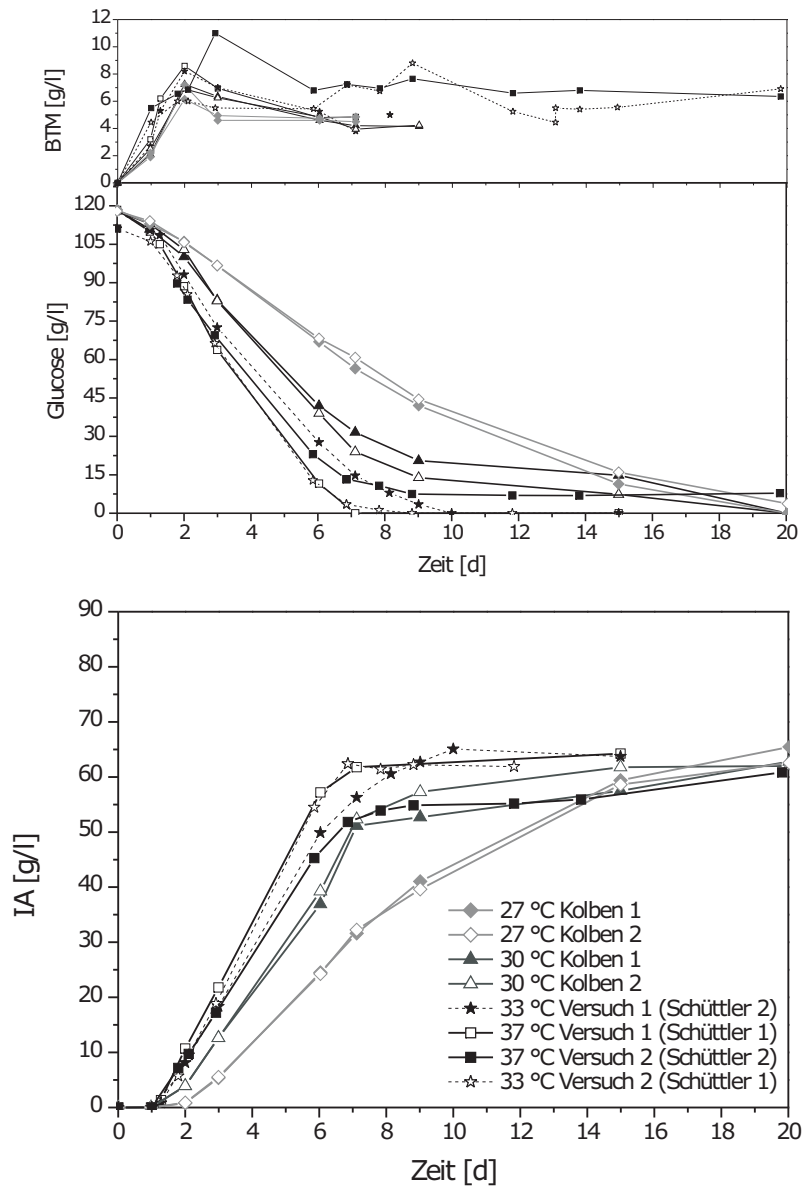


Abbildung 4.4: Variation der Kultivierungstemperatur von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 120 g/l Glucose, 0,04 g/l KH_2PO_4 , Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm

4.1.2.2 Temperaturoptimierung

Die Kultivierungstemperaturen zur fermentativen IA-Herstellung mittels *A. terreus* befinden sich zwischen 30 (Dwiarti et al., 2002; Lockwood and Reeves, 1945), 34 (Batti and Schweiger, 1963; v.Fries, 1966), 37 (Welter, 2000; Jahnz et al., 2003) und 40 °C (Nubel and Ratajak, 1962). Eigene Versuche zeigen, dass die IA-Produktion sowie der Glucoseverbrauch von der Temperatur beeinflusst werden (Abbildung 4.4).

Bei 27 °C werden nach 6 Tagen 25 g/l und nach 15 Tagen 60 g/l IA hergestellt. Bei 30 °C werden nach 6 Tagen 38 g/l und bereits nach 9 Tagen 60 g/l IA produziert. Die

Kultivierungen bei 33 und 37 °C wurden in zwei unabhängigen Versuchen jeweils im Doppelansatz (nicht dargestellt) durchgeführt, wobei die 33 °C Kultivierung des zweiten Versuchsansatzes, in dem Schüttler durchgeführt wurde, in dem bei dem ersten Versuchsansatz die 37 °C Kultivierung durchgeführt wurde und umgekehrt. Die baugleichen Schüttler wurden somit bei diesen zwei Versuchsansätzen im Bezug auf die Kultivierungstemperatur getauscht. Bei den Kultivierungen bei 33 und 37 °C verlaufen die ersten 6 Kultivierungstage der Kolben die im selben Schüttler inkubiert wurden gleich. Unabhängig von der Inkubationstemperatur (33 oder 37 °C) werden nach 6 Tagen 57 g/l IA, in dem Schüttler 1, bzw. 45 (37 °C Versuch 2) und 49 g/l IA (33 °C Versuch 1), in dem Schüttler 2, hergestellt.

Vermutlich hat bei diesen höheren Temperaturen (zwischen 33 und 37 °C) ein bisher nicht bekannter Parameter einen größeren Einfluss auf die IA-Produktion als die Temperatur. Die Unterschiede in der IA-Produktion sind vermutlich nicht in der unterschiedlichen Temperatur sondern durch physikalische Einflüsse der Schüttler begründet.

Nach einem Tag Kultivierung sind Unterschiede in der BTM in Abhängigkeit von der Temperatur vorhanden, jedoch ist unabhängig von der Temperatur nach zwei Tagen Kultivierung die exponentielle Wachstumsphase abgeschlossen.

Eine Versuchsdurchführung bei 40 °C (nicht grafisch dargestellt) zeigt, dass die IA-Produktion bei dieser Temperatur deutlich abnimmt. Da die beste IA-Produktion bei 33 und 37 °C erzielt wird und bei der Wachstumsphase kein deutlicher Unterschied vorhanden ist, werden alle weiteren Versuche aus energetischen Gründen und aufgrund der geringeren Verdunstung bei 33 °C durchgeführt.

4.1.2.3 Substratlimitierung/ Phosphatlimitierung/ Stickstofflimitierung

- **Einfluss des Substratgehaltes**

Bisher wurden 120 g/l Substrat eingesetzt. Bei einer guten Sauerstoffversorgung wird dieses aber nach 10 Tagen vollständig verbraucht (Abbildung 4.2). Somit kann angenommen werden, dass nach 8 Tagen Kultivierung eine Substratlimitierung einsetzt, die Produktivität verringert wird und somit eine Konzentration von mehr als 65 g/l IA nicht erreicht werden kann.

Daher wurde eine Kultivierung mit 180 g/l Glucose durchgeführt, um zu überprüfen ob bei einer Glucoseanfangskonzentration von 120 g/l zum einem nach 8 Tagen aufgrund der Substratlimitierung der Pilz keine weitere IA produziert und zum anderen in wie weit der Pilz durch eine Glucoseanfangskonzentration von 180 g/l gehemmt wird (Abbildung 4.5). Der Substratverbrauch und die IA-Produktion entsprachen denen bei einer Anfangskonzentration von 120 g/l Glucose. Auch bei einer noch ausreichenden Substratkonzentration sinkt die Produktivität unabhängig von der Substratanfangskonzentration nach 6 Tagen Kultivierung. Die Abnahme der Produktivität hängt somit vermutlich nicht mit der Glucosekonzentration zusammen. Nach 7 Tagen Kultivierung betrug die Aubeute 82 mol% und am Kultivierungsende 80 mol%.

Abbildung 4.5 zeigt weiterhin, dass bei 180 g/l Glucose keine Substrathemmung vorliegt. Wird die Glucose vollständig verbraucht, nutzt der Pilz die Itaconsäure als

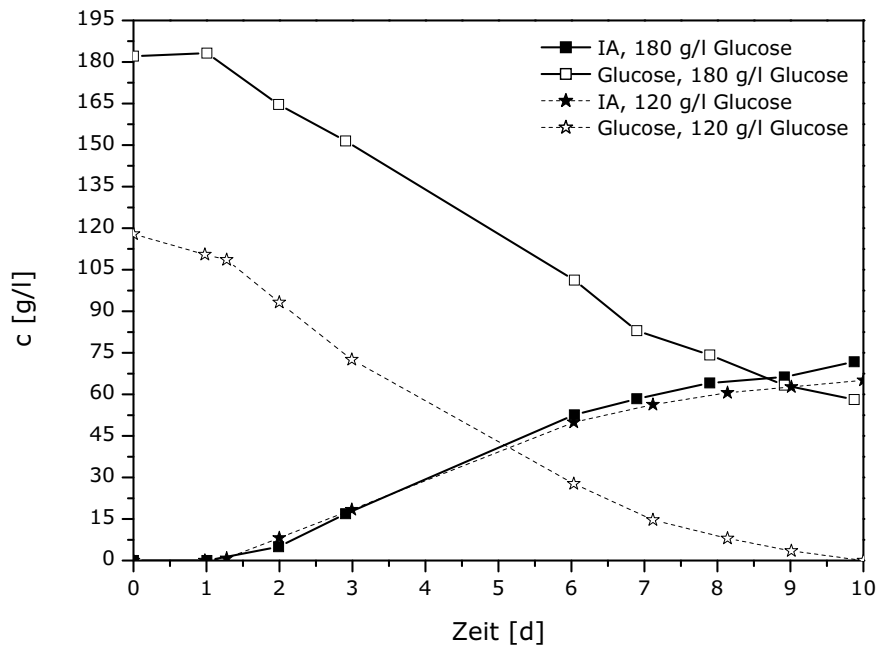


Abbildung 4.5: Höhere Substratanfangskonzentration von 180 g/l im Vergleich zu 120 g/l; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm

Kohlenstoffquelle, daher werden die weiteren Forschungsarbeiten mit einem Glucoseüberschuss von 180 g/l durchgeführt. Aus diesen 180 g/l Glucose kann der Pilz bei einer theoretischen Ausbeute von 100 mol% 130 g/l Itaconsäure herstellen.

• Optimierung des Phosphatgehaltes

Bei den bisherigen Versuchen wurde das Standardproduktionsmedium (Tabelle 3.1, Seite 29) mit 0,04 g/l KH_2PO_4 verwendet⁵. Die IA-Produktion ist wachstumsentkoppelt durch eine Phosphatlimitierung bei $\leq 0,8$ mg/l KH_2PO_4 (Welter, 2000). In dieser Versuchsreihe wird untersucht, in wie weit sich eine erhöhte Phosphatkonzentration auf die Produktion, das Biomassenwachstum sowie auf die Morphologie des Pilzes auswirkt.

Die IA-Produktion beginnt unabhängig von der Phosphatkonzentration (Abbildung 4.6) zwischen 24 und 48 h nach der Inkubation mit Sporen. Zu diesem Zeitpunkt sind ca. 2/3 der exponentiellen Wachstumsphase abgeschlossen. Dies würde bedeuten, dass der Prozess nicht vollständig wachstumsentkoppelt ist. Laut Gyamerah beginnt die IA-Produktion am Ende der Wachstumsphase, ungefähr 35,6 % des Wachstums findet während der IA-Produktionsphase statt (Gyamerah, 1995b). Dieses konnte mit dem *A. terreus* LU02b ebenfalls gezeigt werden.

Nach 6 Tagen Kultivierungsdauer wurden mit höheren ($>0,04$ g/l KH_2PO_4) Phos-

⁵Das Standardproduktionsmedium wurde von dem FNR Projekt 99NR039/22003999-„Verbundvorhaben: Entwicklung von Bindemitteln aus nachwachsenden Rohstoffen für Klebstoffe und Dichtmittel im Bau- und Wohnbereich“ übernommen (Jahnz et al., 2003).

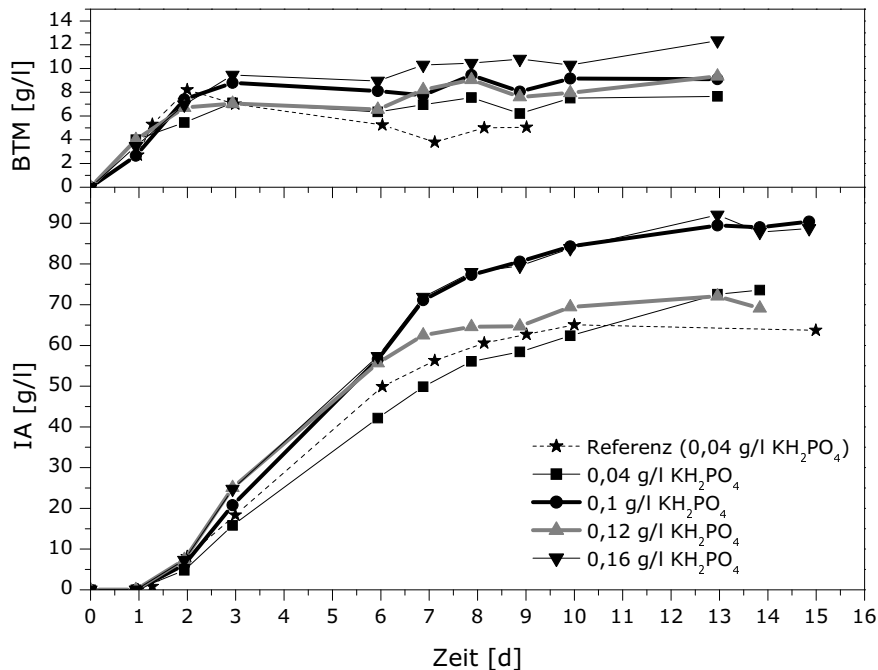


Abbildung 4.6: IA-Produktion und Biomassenwachstum bei Verwendung verschiedener Phosphatkonzentrationen; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 unregelt, 120 Upm

phatkonzentrationen mehr IA produziert. In der stationären Wachstumsphase wurde bei der Kultivierung mit 0,16 g/l KH_2PO_4 $9,8 \pm 1,8$ g/l Biotrockenmasse erreicht. Die Morphologie des Pilzes war helles, aber sehr dichtes Myzel. Die Viskosität der Kultur war deutlich höher, als bei geringeren Phosphatkonzentrationen. Die molare Ausbeute betrug nach 8 Tagen 77 mol% und am Kultivierungsende 74 mol%. Mit 0,1 g/l KH_2PO_4 wurde die gleiche IA-Produktion mit durchschnittlich $8,4 \pm 1,4$ g/l Biotrockenmasse erreicht. Der Pilz wuchs als feines, freies und helles Myzel und die molare Ausbeute betrug nach 7 Tagen 83 mol% und am Ende der Kultivierung 80 mol%. Da aufgrund der Ausbeute und spezifischen Produktivität möglichst wenig Biomasse viel Produkt herstellen soll, wurden alle weiteren Versuche mit 0,1 g/l KH_2PO_4 durchgeführt. Die erzielte IA-Konzentration (75 g/l nach 7 Tagen) mit 0,1 g/l KH_2PO_4 konnte reproduziert werden. Weiterhin konnten erstmals 90 g/l Itaconsäure nach 13 Tagen Kultivierung produziert werden.

• Stickstofflimitierung/- quelle

Erste Untersuchungen zum Einfluss der Stickstoffkonzentration (unter Verwendung des Standardproduktionsmediums mit 0,04 g/l KH_2PO_4 , 3 g/l NH_4NO_3 und 120 g/l Glucose) zeigten, dass eine Halbierung der Ammoniumnitratkonzentration keine Auswirkung auf die IA-Produktion hat (Abbildung 4.7). Die Ammoniumkonzentration (Abbildung 4.8) sinkt während der Wachstumsphase von 320 mg/l auf 150 mg/l und bleibt während der Produktionsphase auf diesem Niveau. Die Nitratkonzentra-

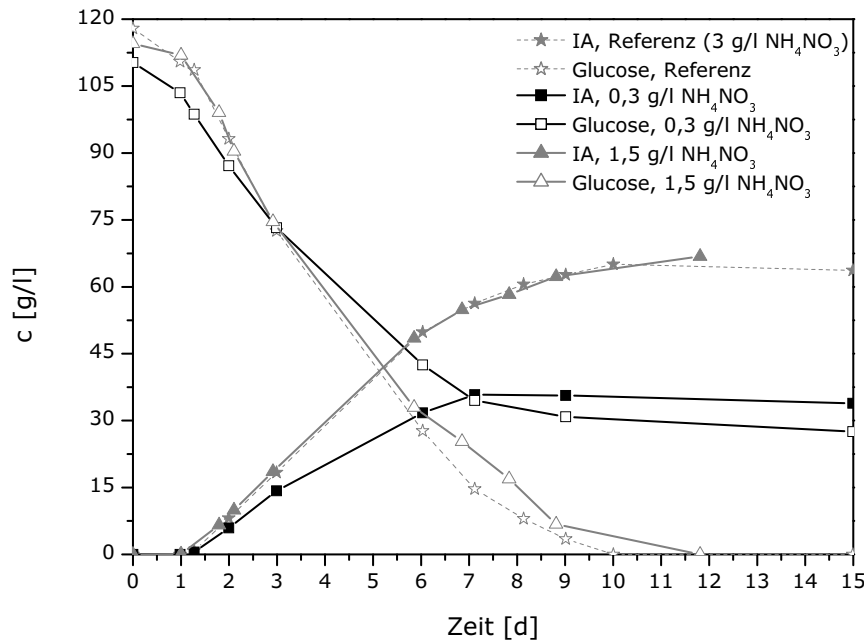
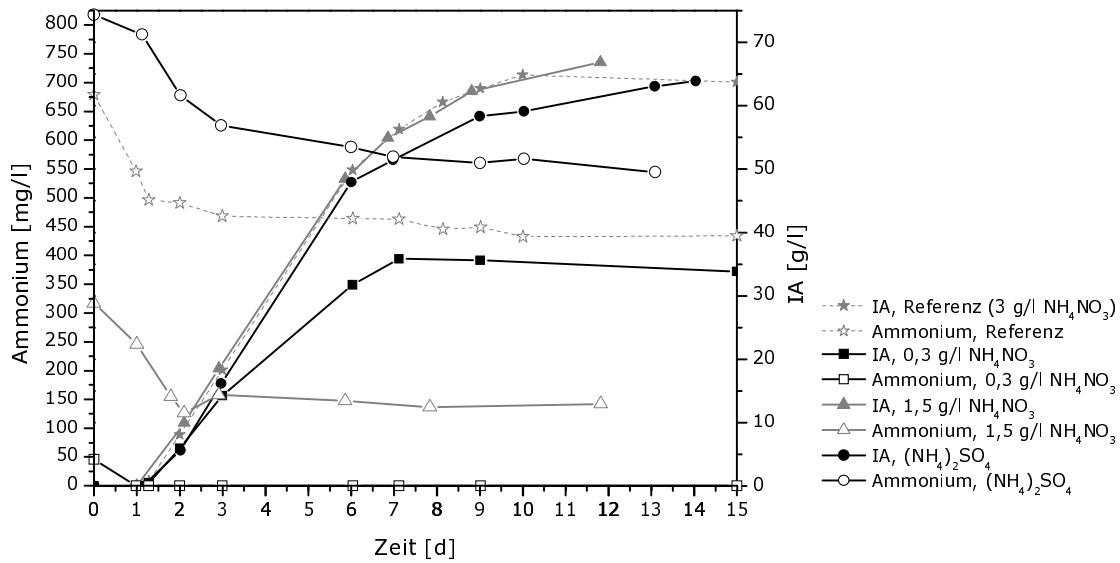


Abbildung 4.7: IA-Produktion und Glucoseverbrauch bei verschiedenen Ammoniumnitratkonzentrationen; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

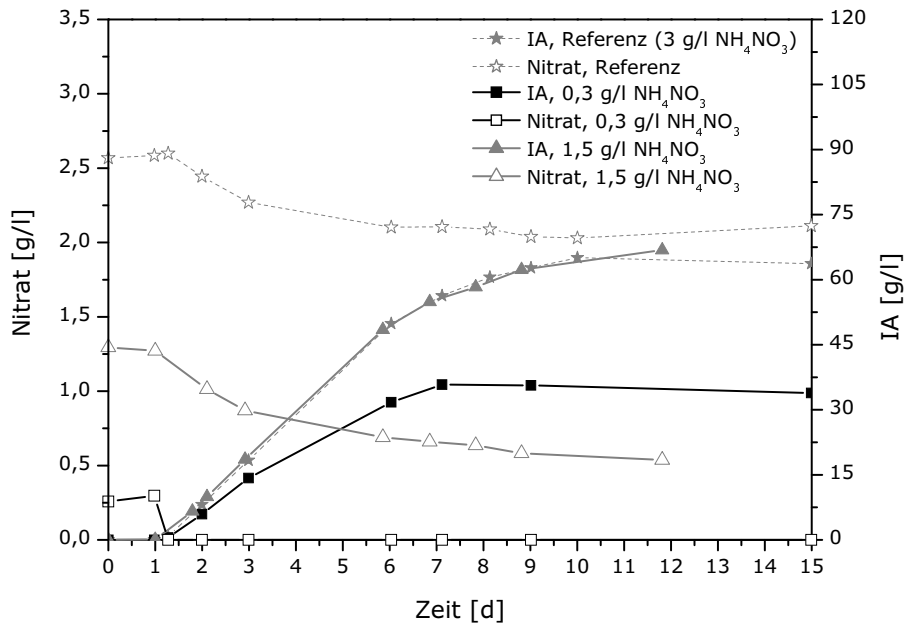
tion (Abbildung 4.9) bleibt während der Wachstumsphase nahezu konstant und sinkt während der Produktionsphase von 1,3 g/l Nitrat auf 0,6 g/l nach 12 Tagen Kultivierungsdauer. Eine Verringerung der Ammoniumnitratkonzentration zu Beginn der Kultivierung auf 0,3 g/l NH_4NO_3 (10 % der Standardkonzentration) zeigt hingegen deutlich negative Auswirkungen auf die IA-Produktion. Während der Keimung der Sporen, innerhalb der ersten 24 Kultivierungsstunden, wird das vorhandene Ammonium vollständig verbraucht. Während dieser Phase bleibt die Nitratkonzentration nahezu konstant, wird aber zu Beginn der Produktionsphase vollständig verbraucht. Dies zeigt, dass bei einer Konzentration von 0,3 g/l NH_4NO_3 nach 1,3 Tagen Kultivierung eine Stickstofflimitierung vorliegt. Die Produktivität ist bei dieser Kultivierung im Vergleich zu 1,5 und 3 g/l NH_4NO_3 von Beginn an niedriger und es werden lediglich 36 g/l IA gebildet.

In weiteren Versuchen wurde mit 2 g/l NH_4Cl (524 mg/l Stickstoff) sowie 3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (636 mg/l Stickstoff) als alleinige Stickstoffquelle (Abbildung 4.8) gezeigt, dass in Schüttelkolbenversuchen im Vergleich zur Standard-Stickstoffquelle NH_4NO_3 kein Unterschied in der IA-Produktion, innerhalb der ersten 6 Kultivierungstage, vorhanden ist.

Der Pilz nutzt vermutlich den Stickstoff aus dem Ammonium während der Wachstumsphase als Stickstoffquelle. Er verbraucht während der Wachstumsphase, bei einer Standardkultivierung (3 g/l NH_4NO_3), ungefähr 45 % des eingesetzten Stickstoffs (=247 mg/l Stickstoff (aus NH_4)). Während der Produktionsphase verändert sich die Ammoniumkonzentration nicht signifikant. Steht nicht ausreichend Ammo-



Abbildungung 4.8: IA-Produktion und Ammoniumkonzentration bei verschiedenen Ammonium-nitratkonzentrationen und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm



Abbildungung 4.9: IA-Produktion und Nitratkonzentration bei verschiedenen Ammoniumnitratkonzentrationen; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt, 120 Upm

nium zur Verfügung, wie bei der Verwendung von 0,3 g/l NH_4NO_3 (=52,5 mg/l Stickstoff (aus NH_4)), nutzt der Pilz vermutlich auch das Nitrat als Stickstoffquelle, da das Nitrat, nach dem Verbrauch des Ammoniums, ebenfalls vollständig verbraucht wird. Dem Pilz standen 105 mg/l Gesamtstickstoff zur Verfügung und es lag vermutlich eine Stickstofflimitierung vor, da der Pilz während der Wachstumsphase unter Standardbedingungen ungefähr 247 mg/l Stickstoff verbraucht.

Während der Wachstumsphase nutzt der Pilz, bei einer ausreichenden NH_4NO_3 Konzentration, den Stickstoff des Nitrates vermutlich nicht als Stickstoffquelle, da keine Abnahme vorhanden ist. Während der Produktionsphase sinkt die Nitratkonzentration hingegen um ungefähr 50 %. Bei einer Standardkultivierung (3 g/l NH_4NO_3) steht während der Produktionsphase mit 327 mg/l Stickstoff des Ammoniums ausreichend Stickstoff als Quelle zur Verfügung. Da der Pilz diesen aber nicht verbraucht, nutzt er vermutlich den Stickstoff des Nitrates nicht als Stickstoffquelle sondern nutzt das Nitrat als Redoxmittel. Inwieweit dies die Kultivierung von *A.terreus* und insbesondere die IA-Produktion beeinflusst muss in weitergehenden Arbeiten genauer untersucht werden.

Unter Standardbedingungen, 3 g/l NH_4NO_3 , liegt keine Stickstofflimitierung vor. Um die weiteren Ergebnisse mit den bisherigen Versuchen vergleichen zu können und um eine Stickstofflimitierung zu vermeiden, werden weiterhin 3 g/l NH_4NO_3 bei den folgenden Versuchen als Stickstoffquelle eingesetzt.

4.1.2.4 Einfluss der Sporenlagerung bei 4 °C auf die Aktivität des Pilzes *Aspergillus terreus* LU02b

Die Sporen werden auf Czapek-Dox Agar vermehrt, mit einer NaCl Lösung (0,9 % w,v) geerntet (Kapitel 3.1.1, Seite 28) und anschließend bis zum Animpfen bei 4 °C gelagert. Um zu untersuchen ob die Zeit der Lagerung bei 4 °C einen Einfluss auf das Wachstum und die Produktivität des Pilzes hat, wurden Sporen, die 2 Wochen, 0,5, 1 und 1,5 Jahre bei 4 °C gelagert wurden, parallel unter den gleichen Bedingungen kultiviert (Abbildung 4.10).

Das Wachstum sowie die IA-Produktion zwei Wochen alter Sporen entsprach denen mit frischen Sporen (siehe Referenz, Abbildung 4.6). Bei den Kultivierungen mit 0,5, 1 und 1,5 Jahren gelagerten Sporen war nach einem Tag Inkubation kein Wachstum erkennbar. Nach zwei Tagen war aber zwischen den verschiedenen Ansätzen kein Unterschied im Wachstum vorhanden und nach drei Tagen wurde ungefähr 4 g/l Biomasse gebildet. Bei der Citronensäureherstellung stellte Omar einen großen Einfluss des Sporenalters bei *Aspergillus niger* Stamm 836 fest. Wurden die Sporen ein Jahr gelagert, sank die Produktbildung im Vergleich zu frisch geernteten Sporen von 80 g/l auf 5 g/l (Omar et al., 1992). Dieses trat bei der Itaconsäureherstellung mittels *A. terreus* LU02b nicht auf. Die IA-Produktion ist bei 0,5, 1 und 1,5 Jahren gelagerten Sporen im Vergleich zu den frischen Sporen ca. einen halben Tag verzögert. Jedoch ist die Biomassenbildung, die IA-Produktivität sowie die IA-Endkonzentration unabhängig von der Zeit der Lagerung der Sporen bei 4 °C.

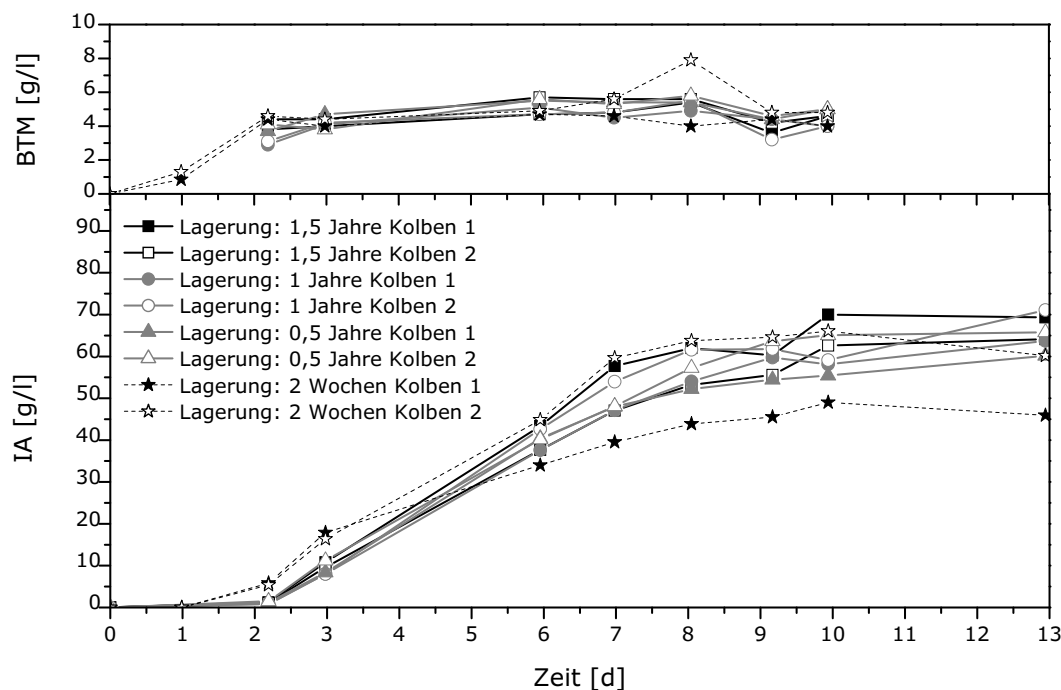


Abbildung 4.10: Unterschiedliche Lagerungszeit der Sporen; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben, 33 °C, Start pH 3,1 unregelt, 120 Upm

Das bedeutet, dass eine größere Menge an Sporen als Vorrat hergestellt werden kann. Dieser kann über einen längeren Zeitraum (Lagerung bei 4 °C bis 1,5 Jahre) als Inokulum für Kultivierungen eingesetzt werden. Die lag-Phase ist ungefähr einen halben Tag verlängert. Aber die Sporenerzeugung und Ernte für jede einzelne Kultivierung würde entfallen. Die Kultivierungsvorbereitungszeit mit der derzeitigen Methode der Bereitstellung des Inokulums (Sporenerzeugung, Sporenernte und Bestimmung der Konzentration) würde somit deutlich verkürzt werden.

4.1.3 Diskussion: Kultivierung im Schüttelkolben

Nach einer Medien-Optimierung war die maximal erreichte IA-Konzentration von K. Welter 49 g/l nach 8 Tagen Kultivierung (Welter, 2000) (Abbildung 4.11). In dem nachfolgenden Projekt konnte mit dem Eigenisolat *A. terreus* LU02b im 1,5 l Glasrührreaktor unter Glucosezudosage 78 g/l IA aber nach einer Kultivierungszeit von 25 Tagen hergestellt werden (Jahnz et al., 2003). Eigene Versuche zeigten, dass bei einer Sauerstoffunterbrechung von 10 Minuten (schlechte Sauerstoffversorgung) die IA-Produktivität sowie die erreichte Konzentration deutlich schlechter sind im Vergleich zu parallel Versuchen mit einer nahezu kontinuierlichen Sauerstoffversorgung (gleichmäßige Sauerstoffversorgung). Die Morphologie des Pilzes ist bei einer gleichmäßigen Sauerstoffversorgung kein Gemisch aus Myzel und dunklen Pellets, sondern einheitliches lockeres Myzel.

Laut Literatur wird bei Sauerstoffmangel weniger NADH verbraucht und dessen Konzentration steigt an, wodurch die Isocitrat-Dehydrogenase und die Citrat-Synthase ge-

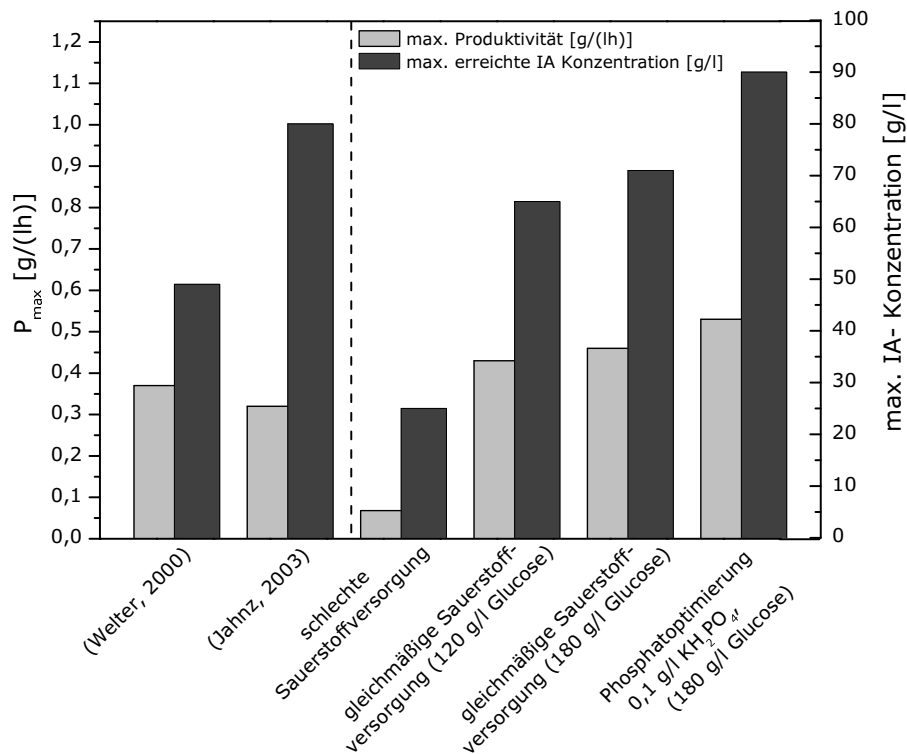


Abbildung 4.11: Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA-Konzentrationen in 250 ml Erlenmeyerkolben und 1,5 l Glasfermenter (Jahnz et al., 2003)

hemmt werden und der Citratzyklus zum Erliegen kommt (Karlson et al., 1994). Die Citrat-Synthase stellt aber die Citronensäure, aus der die Vorstufe der IA synthetisiert wird, bereit. Weiterhin muss der pH-Wert innerhalb der Zellen, gegen einen äußeren pH-Wert von 2,0, auf pH 6,0-7,0 gehalten werden, da die cytoplasmatischen Enzyme dort ihr Optimum besitzen. Außerdem muss die IA, die im Cytoplasma hergestellt wird, gegen einen Konzentrationsgradienten nach außen ins Medium abgegeben werden. Diese beiden energieabhängigen Prozesse forcieren eine kontinuierliche ATP Versorgung. Eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung zur ausreichenden Versorgung mit ATP ist somit für die IA-Produktion durch den filamentösen Pilz *Aspergillus terreus* notwendig.

Unter diesen Bedingungen konnte mit einer maximalen Produktivität von 0,43 g/(lh) nach 10 Tagen Kultivierung im Schüttelkolben eine IA-Endkonzentration von 65 g/l erreicht werden. Da, zu diesem Zeitpunkt, die Glucose vollständig verbraucht war, wurde mit einer höheren Glucoseanfangskonzentration (180 g/l) unter gleichen Bedingungen die Kultivierung durchgeführt. Die maximale Produktivität weicht mit 0,46 g/(lh) nicht signifikant von der Referenz Kultivierung mit 120 g/l Glucose ab. Die erreichte Endkonzentration ist mit 71 g/l nicht deutlich verbessert. Da die Kurvenverläufe des Glucoseverbrauches und der IA-Produktion unabhängig von der Höhe der eingesetzten Glucosekonzentration (120 g/l und 180 g/l) verlaufen, kann sowohl eine Substratlimitierung wie auch eine Substrathemmung durch diese hohe Startkonzentration von 180 g/l ausgeschlossen werden. Bei der Phosphatoptimierung hingegen konnte mit 0,1 g/l KH_2PO_4 eine maximale Produktivität von 0,53 g/(lh) und 90 g/l IA nach lediglich 13 Tagen Kultivierung erreicht

werden. Die Biomasse ist mit $\sim 8,4$ g/l ungefähr um 2 g/l gegenüber der Referenz erhöht. Die erreichte Produktivität zeigt aber, dass bei dieser Biomassenkonzentration die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gegenüber der Referenz nicht schlechter ist. Mit dem gleichen Medium⁶ und dem gleichen Stamm konnte somit im Vergleich zu dem bisherigen Stand an der FAL die maximale Produktivität um 0,21 g/(lh) und die Endkonzentration um 12 g/l bei einer gleichzeitigen Halbierung der Fermentationsdauer erreicht werden. Weiterhin wurde die molare Ausbeute von 50 % auf 80 % gesteigert.

Unter Standardbedingungen, mit 3 g/l NH_4NO_3 , liegt während der fermentativen IA-Herstellung keine Stickstofflimitierung vor. Wird die Ausgangskonzentration auf 10 % reduziert tritt bereits nach 24 Stunden eine Stickstofflimitierung ein und die IA-Produktivität sowie die erreichte Endkonzentration ist im Vergleich zu Kultivierungen ohne Stickstofflimitierung deutlich niedriger. Inwieweit das Nitrat als Redoxmittel die IA-Produktion beeinflusst muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Die Ergebnisse im Schüttelkolben konnten mehrfach reproduziert werden. Dennoch ist bei diesen Kultivierungen zwischen den Doppelansätzen vereinzelt eine Abweichung in der Produktion vorhanden. Bei den Versuchen zur Sporenlagerung ist z.B. eine Abweichung des Kolben 2 der zwei Wochen alten Sporen (Abbildung 4.10) von der Produktion des Kolben 1 vorhanden. Die Versuche zur Handhabung (Kapitel 4.1.2.1, Seite 54) zeigen, dass die Sauerstoffversorgung im Schüttelkolben die IA-Produktion stark beeinflusst. Daher kann diese Abweichung zwischen den Doppelansätzen in der Handhabung während der Probenahme begründet sein. Vermutlich ist bei der Probenahme nach drei Tagen die Sauerstoffversorgung schlechter gewesen, da die IA-Produktion nach diesem Zeitpunkt stark von dem Parallelansatz abweicht. Dadurch, dass während der Probenahme die Erlenmeyerkolben per Hand weiter geschüttelt werden, wird versucht die Unterbrechung der Sauerstoffversorgung zu minimieren. Hinzu kommt, dass die verwendeten Erlenmeyerkolben 3 Schikanen besitzen, die für den Sauerstoffeintrag während der Submerskultivierung von *Aspergillus terreus* notwendig sind. Diese Schikanen werden aber manuell gefertigt, so dass diese Kolben nicht gleich sind. Da diese Einflüsse bei der Kultivierung in Erlenmeyerkolben aber nicht ausgeschlossen werden können, werden weitere Untersuchungen im Fermenter durchgeführt.

4.2 Untersuchung der IA-Herstellung im 1,5 l Rührreaktor

Die IA-Herstellung wird ausgehend von den Schüttelkolbenversuchen in den 1 l Maßstab übertragen. Die Kultivierungen werden in einer 4fach Fermenteranlage (Kapitel 3.1.4, Seite 31) durchgeführt. Somit kann der Einfluss der IA-Produktion durch Probenahmen sowie unterschiedlicher Schüttelkolben ausgeschlossen werden. Weiterhin kann in vier parallelen Ansätzen unter gleichen Bedingungen kultiviert werden.

Bei den Kultivierungen im Fermenter kann erstmals der Gelöstsauerstoff, der pH Verlauf

⁶Mit Ausnahme der Phosphatkonzentration, 0,1 g/l KH_2PO_4 , sowie einer erhöhten Substratanfangskonzentration

und das Redoxpotenzial online gemessen werden. Bei den Kultivierungen im Schüttelkolben sank unabhängig von der Substratkonzentration nach 6 Tagen die Produktivität. Die Ursache dieser starken Abnahme soll in diesem Kapitel untersucht werden.

4.2.1 Sauerstoffversorgung

Die Schüttelkolbenversuche zeigen, dass eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung notwendig ist (Kapitel 4.1.2.1, Seite 54). Dieser Parameter soll daher näher untersucht werden. Die Begasung erfolgt über eine Edelstahlfritte. Diese ist im Fermenter so angeordnet, dass die feinen austretenden Gasblasen direkt von dem Rührsystem (ca. 2 cm über dem Reaktorboden) verteilt werden. Dies ist für eine gleichmäßige Verteilung und hohe Verweilzeit der Gasblasen im Reaktorinnenraum notwendig. Außerdem entstehen aufgrund der hohen Glucoseanfangskonzentration sehr kleine Gasblasen, was den Sauerstoffübergang von der Gasphase in die Flüssigphase begünstigt.

Zu Fermentationsbeginn wird das Medium mit Sauerstoff gesättigt und anschließend wird die Zuluft gestoppt. Der Reaktor wird mit Sporen beimpft. Diesen Sporen steht während der Keimung der Gelöstsauerstoff zur Verfügung. Sinkt der Gelöstsauerstoffpartialdruck unter 10 % wird die Zuluft manuell stufenweise geöffnet um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Während der Wachstums- und Produktionsphase wird der Reaktor kontinuierlich mit Sauerstoff versorgt. Die Begasung beträgt in der Regel 0,5 bis 1 v/vm.

Aufgrund der hohen, aber während der Wachstumsphase notwendigen, Begasungsrate kommt es sehr schnell zu Flotation⁷. Dadurch kommt es zum Biomassenauswurf und Übersäumen des Reaktors (Abbildung 4.12). Die Biomasse wird aus der Flüssigphase ausgetragen und lagert sich oberhalb der Phasengrenze an der Reaktorinnenwand an. Setzt im weiteren Verlauf eine starke Schaumbildung ein, tritt dieser Schaum samt Biomasse über die Abluftstrecke aus. Um dies zu verhindern wird nach einem Tag Kultivierung 0,3 ml/l Antischaummittel (Ucolup N-115, Brenntag Mineralöl GmbH, Mülheim a. d. Ruhr) zugegeben. Indem das Antischaummittel während der Wachstumsphase vor der ersten Schaumbildung zugegeben wird, tritt während der gesamten Fermentation keine Schaumbildung auf.

Die Keimung der Sporen findet innerhalb der ersten 15 Stunden der Kultivierung statt. Bei einer manuellen Sauerstoffregelung wird nicht immer zum gleichen Zeitpunkt die Sauerstoffzufuhr geöffnet. Um zu vermeiden, dass eine Sauerstofflimitierung eintritt und um einen konstanten Partialdruck während der gesamten Fermentation einzustellen wird eine Sauerstoffregelung in die Fermentieranlage integriert.

4.2.1.1 Sauerstoffregelung

Bei dem Fermenter 1 der 4fach Multifermentieranlage wurde eine Sauerstoffregelung installiert. Der Regler wurde in das Schaltbild der Datenverarbeitung (DaisyLab 6.0) aufgenommen. Der Sollwert des konstant zu haltenden Sauerstoffpartialdrucks wurde auf 25 % eingestellt. Der online Sauerstoffpartialdruck des Fermenters dient dem Regler als Ein-

⁷Myzel haftet an den feinen Luftblasen und schwimmt mit den Luftblasen nach oben.

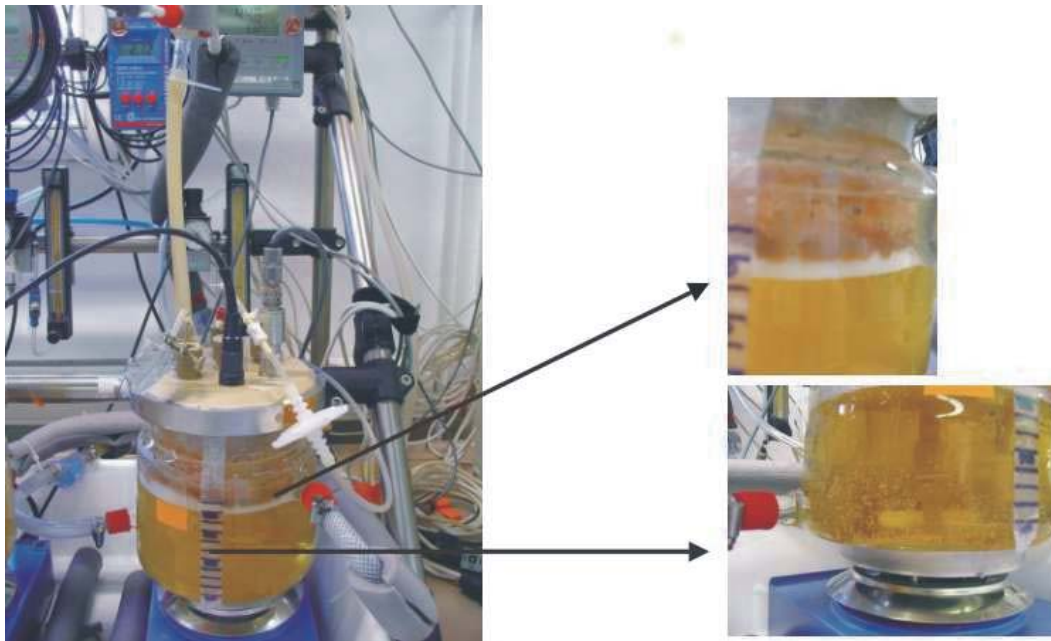


Abbildung 4.12: Biomassenaustrag im 1,5 l Glasfermenter der 4fach Fermenteranlage; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

gangssignal (Istwert). Fällt der Sauerstoffpartialdruck infolge der Sporenkeimung unter 25 %, setzt die Regelung ein und die Zuluft wird entsprechend der Abweichung zwischen Soll- und Istwert geöffnet. Bei den Fermentern 2-4 wird die Zuluft weiterhin manuell eingestellt.

In der Abbildung 4.13 ist der Gelöstsauerstoffpartialdruck in der oberen Kurve dargestellt. Zu Beginn der Fermentation war im Fermenter 1 die Zuluft durch den Sauerstoffregler geschlossen, da der Istwert weit über den vorgegebenen Sollwert von 25 % lag. Im Fermenter ohne Sauerstoffregelung wurde die Zuluft manuell geschlossen. Infolge der Sporenkeimung beginnt die Sauerstoffzehrung. Nach 10 Stunden wurde die Zuluft abhängig vom Istwert des Sauerstoffpartialdruckes geregelt. Nach 1,5 Tagen war die Zuluft mit 0,8 v/vm vollständig geöffnet, reichte aber nicht aus um den Sauerstoffpartialdruck auf 25 % zu halten. Während dieser Phase befand sich der Pilz in der Wachstumsphase. Nach ungefähr 2 Tagen war die Wachstumsphase beendet und die Regelung hielt den Gelöstsauerstoffpartialdruck auf ungefähr 25 %.

Bei der Fermentation ohne Sauerstoffregelung war der Verlauf des Gelöstsauerstoffpartialdruckes innerhalb der ersten 10 Stunden vergleichbar der Fermentation mit Regelung. Die Zuluft wurde aber erst nach 15,5 Stunden manuell auf 0,2 v/vm geöffnet, worauf der pO_2 (gemessener Gelöstsauerstoffpartialdruck im Medium) sofort auf 100 % anstieg. Zwischenzeitlich war der pO_2 allerdings für 2 Stunden unter 5, aber über 1,5 %. Nach 24 Stunden und bis zum Ende der Fermentation wurde die Zuluft auf 0,5 v/vm eingestellt. Die IA-Produktion setzt unabhängig von der Regelung zwischen 1 und 1,5 Tagen ein. Zu diesem Zeitpunkt war der pH-Wert von 3,1 auf 1,8-2,0 abgesunken und blieb bis zum Fermentationsende auf diesem Niveau. Ohne Sauerstoffregelung setzte die IA-Produktion ungefähr 8 Stunden verzögert ein. Diese Verzögerung beim Produktionsstart könnte daran

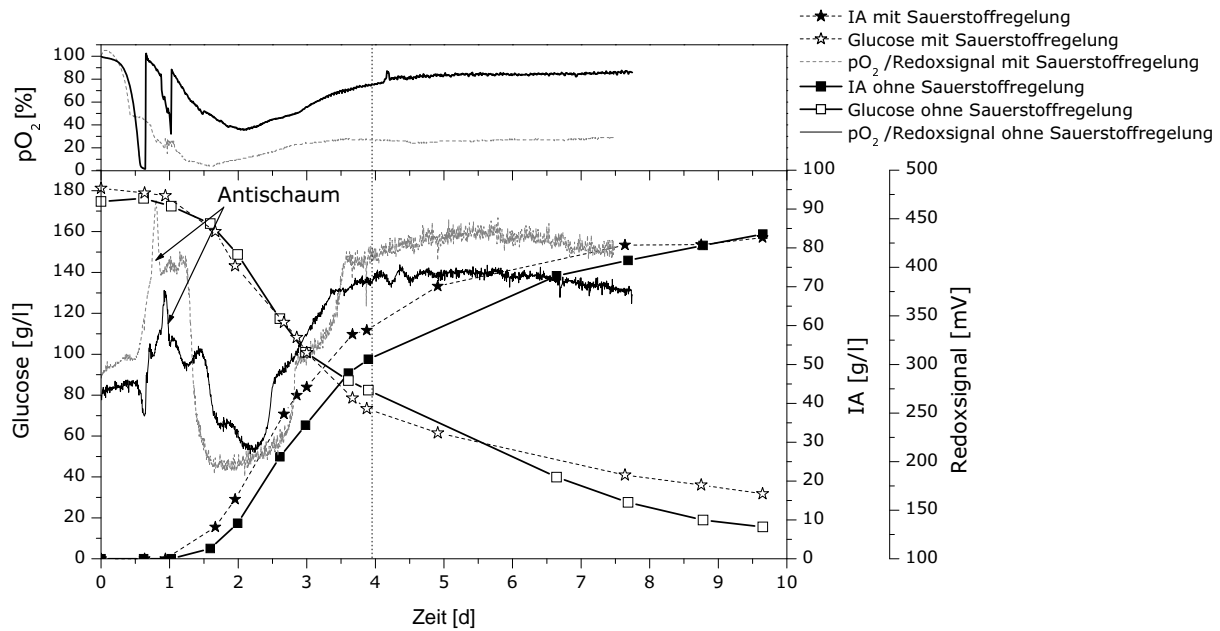


Abbildung 4.13: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung - ohne Sauerstoffregelung, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

liegen, dass der Fermenter während der Sporenkeimung für 2 Stunden zwischen 1,5 und 5 % lag.

In der größten Produktionsphase zwischen dem 2. und 3. Tag ist kein nennenswerter Unterschied zwischen diesen beiden Fermentationsverläufen erkennbar. Nach 2,5 Tagen ist eine geringe und nach 4 Tagen eine deutliche Produktionsabnahme unabhängig von der Sauerstoffversorgung und von dem Gelöstsauerstoffpartialdruck (25% zu 80%) vorhanden. In beiden Fermentationen wird eine Endkonzentration von 83 g/l IA erreicht.

Durch die Zugabe des Antischaummittels sinkt der Gelöstsauerstoffpartialdruck und das Redoxpotenzial zeigt einen positiven Ausschlag. Das Signal der Redoxelektrode hat am Ende der Wachstumskurve, nach 2 Tagen, ein Minimum erreicht. Bis zum ersten Einknicken der Produktivität nach 2,5 bzw. 3 Tagen steigt das Signal stark an. In diesem Bereich kommt es zu einer Hysterese. Im weiteren Verlauf, bis zur deutlichen Produktionsabnahme nach 4 Tagen, steigt das Signal weiter und bleibt nach diesem 4. Tag konstant. Es konnte bisher nicht geklärt werden, was die Ursache für die Hysterese im Redoxsignal bzw. für das Umschalten der Produktionsgeschwindigkeiten der IA ist. Zu den Zeitpunkten zu denen das Redoxsignal Veränderungen anzeigt, sind in den Verläufen des pH-Wertes und des Gelöstsauerstoffpartialdruckes keine Auffälligkeit vorhanden. Anhand dessen lässt sich ausschließen, dass diese beiden Parameter den Verlauf des Redoxsignals während der Produktionsphase verursachen.

Im 1,5 l Rührreaktor ist ein stabiler, reproduzierbarer Prozess etabliert. In beiden Fermentationen war während der Produktionsphase eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung gegeben. Der Unterschied im Gelöstsauerstoffpartialdruck während der Produktionsphase, 25% zu 80 %, wirkt sich anscheinend nicht auf die Fermentation aus.

Eine Unterbrechung der Zuluft hingegen zeigt auch im Fermenter deutliche Auswirkungen

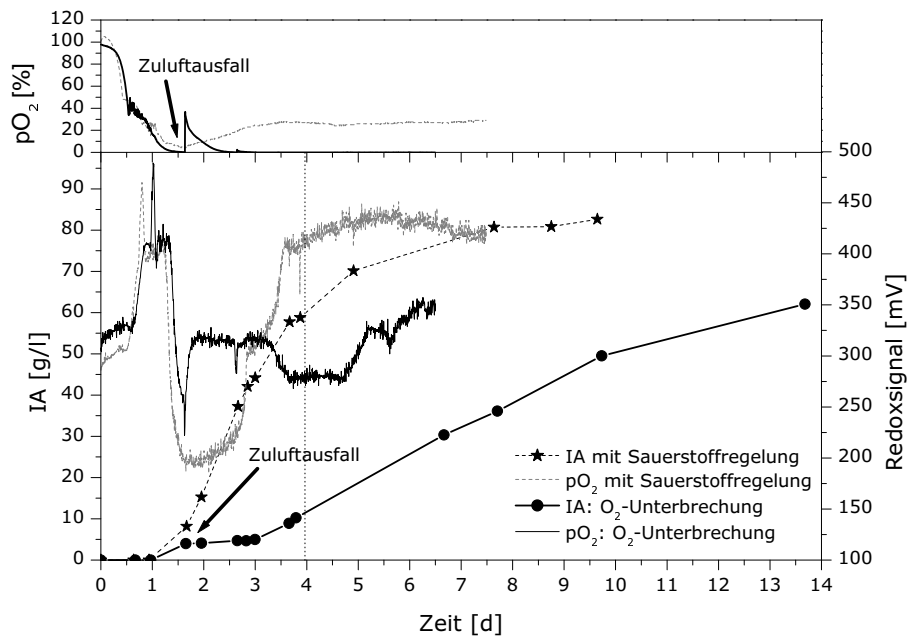


Abbildung 4.14: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung - Zuluftausfall (1 h), Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt

auf die Fermentation (Abbildung 4.14). Nach dem Ausfall konnte 36 Stunden keine weitere IA-Produktion gemessen werden. Es bildeten sich wie in dem Schüttelkolbenversuch (Abbildung 4.3, Seite 56) kleine dunkle Pellets. Im weiteren Fermentationsverlauf wurde nach dem Zuluftausfall trotz kontinuierlicher Begasung die IA-Produktivität der Kultivierung mit Sauerstoffregelung nicht erreicht. Zur fermentativen IA-Herstellung mit dem Pilz *A. terreus* scheint eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung mit einem $pO_2 > 5\%$ für eine reproduzierbare IA-Produktion notwendig zu sein.

4.2.1.2 Sauerstoffoszillation

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss einer konstanten vergleichend zu einer oszillierenden Sauerstoffversorgung untersucht. Bei der fermentativen Glucoseoxidase Produktion durch *Aspergillus niger* konnte gezeigt werden, dass eine oszillierende Sauerstoffversorgung (Periode=140 s) die Enzymkonzentration sowie dessen Transport aus der Zelle positiv beeinflusst (Träger et al., 1992). Bei der fermentativen IA-Produktion im Schüttelkolben konnte gezeigt werden, dass Unterbrechungen der Sauerstoffversorgung von 10 Minuten sich negativ auf die IA-Produktion auswirken (Abbildung 4.2, Seite 55). Bei einer kontinuierlichen Sauerstoffversorgung scheint die Fermentation während der Produktionsphase nicht von der Höhe des Gelöstsauerstoffpartialdruckes abzuhängen (Abbildung 4.13). Im folgenden wurde untersucht, ob eine Oszillation der Zuluft/der Begasungsrate einen ähnlich positiven Einfluss auf die Fermentation zeigt, wie bei der Glucoseoxidase Fermentation durch *A. niger*.

Eine Oszillation der Begasungsrate mit einer Periode von 100 s (Abbildung 4.15)

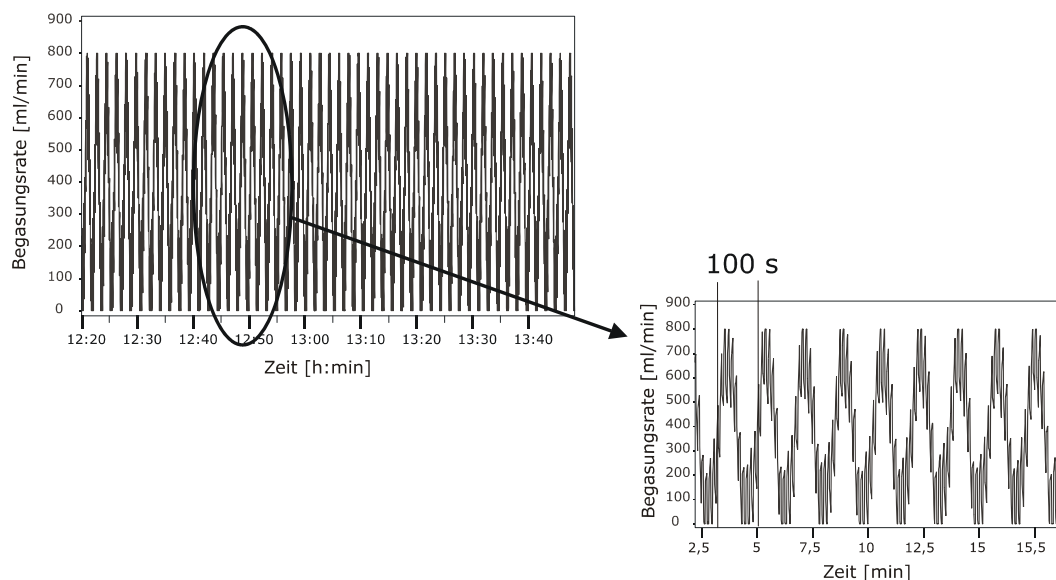


Abbildung 4.15: Zuluft der Sauerstoff-Oszillation (Begasungsrate), Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter mit Zuluftregelung (oszillierend, Periode=100 s)

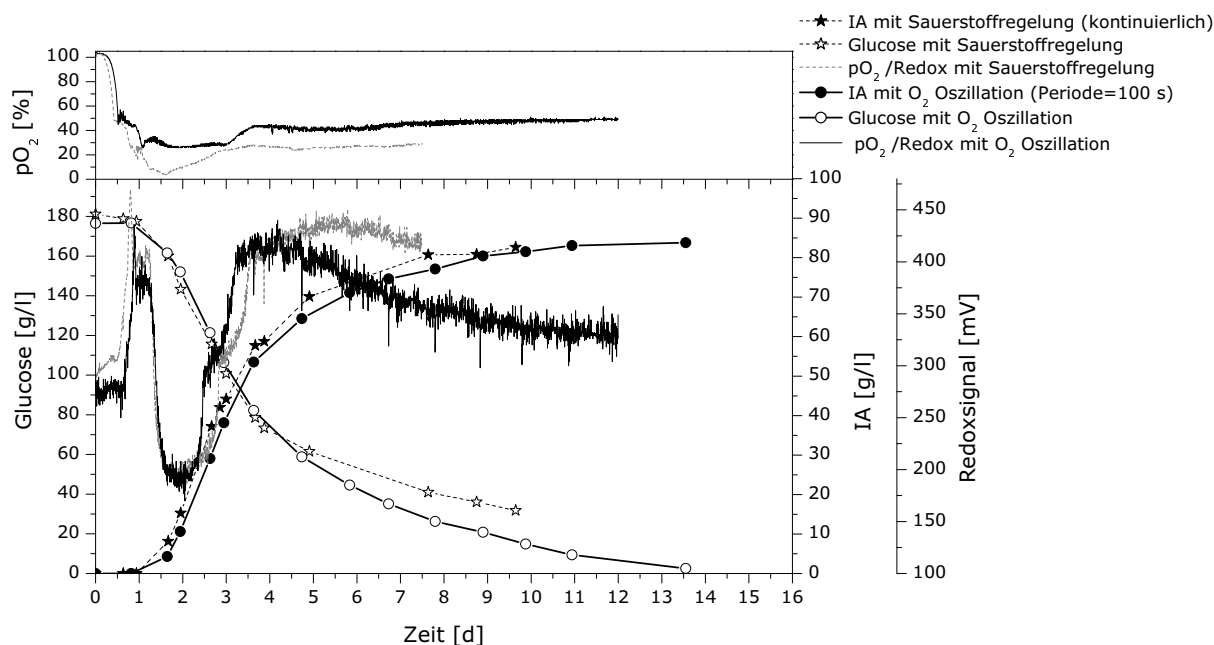


Abbildung 4.16: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Zuluftregelung (Begasungsrate ist oszillierend, Periode=100 s), Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

wirkt sich nicht auf die IA-Produktion, den Glucoseverbrauch und das Redoxpotenzial aus (Abbildung 4.16). Die gleichförmige, periodische Schwingung (100 s) der Zuluft zwischen 0 und 0,8 v/vm bewirkte keinen signifikanten Einfluss auf den Gelöstsauerstoffpartialdruck (Abbildung 4.16).

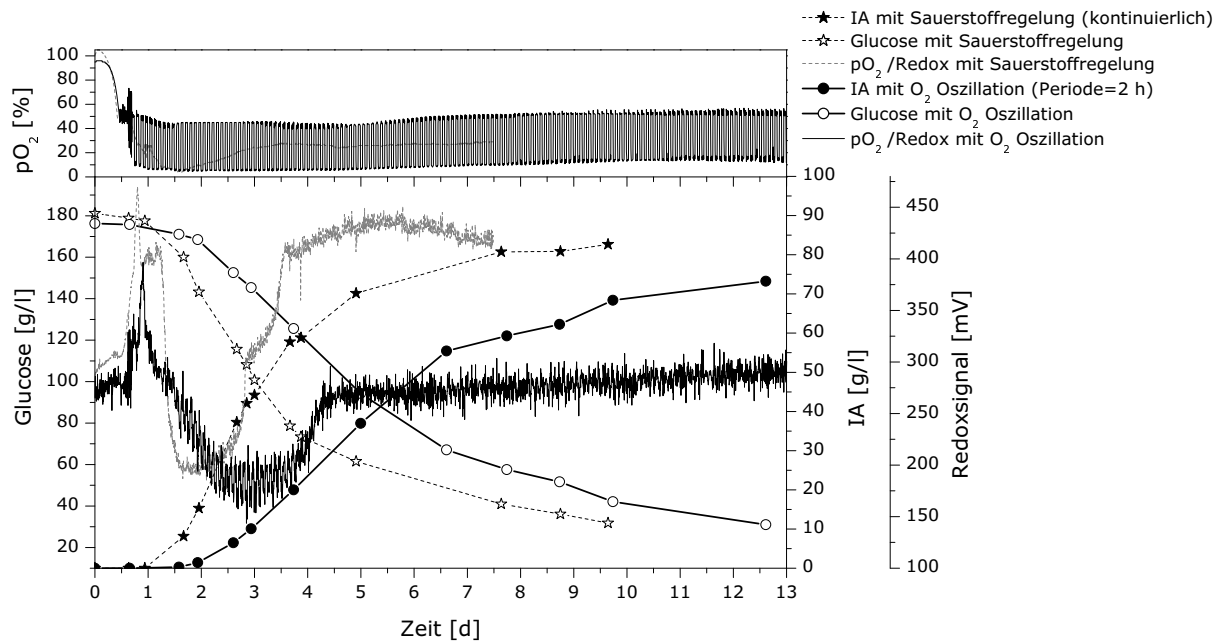


Abbildung 4.17: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Zuluftregelung (oszillierend, Periode=2 h), Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Um eine Veränderung des Gelöstsauerstoffpartialdruckes zu erzwingen wird der Sauerstoffregler so eingestellt, dass er abwechselnd je 1 Stunde den Gelöstsauerstoffpartialdruck im Medium auf 45 % und 5 % hält. Apparativ hat diese Regelung funktioniert. Der Regler hat die Zuluft entsprechend der Differenz zwischen dem Istwert des pO_2 und Sollwert (abwechselnd 1 Stunde 45%, 1 Stunde 5 %) geregelt, so dass der gemessene pO_2 Wert im Medium tatsächlich den entsprechenden Sollwert erreicht (Abbildung 4.17, obere Grafik). Somit kann eine nahezu gleichförmige, periodische Schwingung (2 h) des Gelöstsauerstoffpartialdruckes im Medium erreicht werden. Wie in der unteren Grafik der Abbildung 4.17 zu erkennen, führt dieser Versuchsansatz zu einer Verschlechterung der IA-Produktion. Zum einen setzt die IA-Produktion 1 Tag später ein als bei der Fermentation mit einer kontinuierlichen Sauerstoffregelung (Sollwert 25 %), zum anderen ist die Produktivität deutlich geringer. Der Knick in der Produktivität, der bei einer Standardfermentation nach 4 Tagen auftritt, tritt bei diesem Versuchsansatz nach 6,5 Tagen ein und es wird lediglich eine IA-Enkonzentration von 73 g/l erreicht. Die molare Ausbeute beträgt 70 mol%. Wie bei der Kultivierung mit Zuluftausfall (Abbildung 4.14) wird auch bei dieser Kultivierung vermehrt Gluconsäure (20 g/l nach 13 Tagen Kultivierung) als Nebenprodukt gebildet. Auf die Nebenproduktbildung wird im Kapitel 4.2.5.1, Seite 87 genauer eingegangen.

Durch diese beiden Versuchsansätze (periodische Schwingung (100 s) der Begasungsrate zwischen 0 und 0,8 v/vm und periodische Schwingung (2 h) des Gelöstsauerstoffpartialdruckes im Medium) konnte keine Verbesserung der IA-Produktion erzielt werden.

4.2.2 Diskussion: Kultivierung im 1,5 l Rührreaktor, Einfluss der Sauerstoffregelung und -oszillation

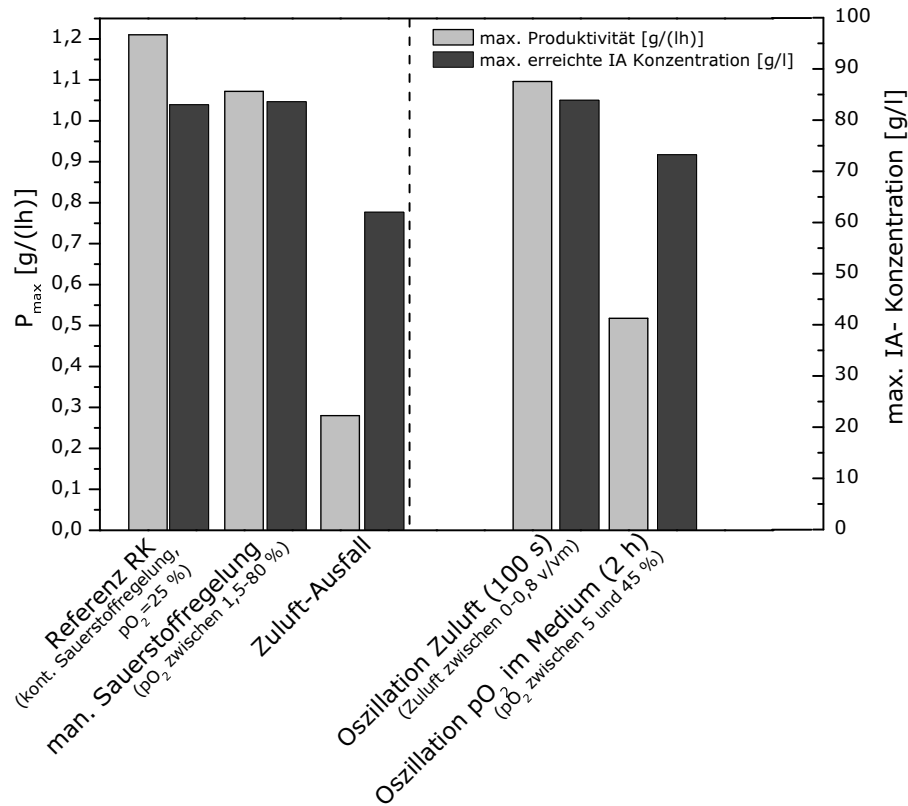


Abbildung 4.18: Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA-Konzentrationen in 1,5 l Glasfermenter unter verschiedenen Sauerstoffversorgungen, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Der Vergleich der unterschiedlichen Sauerstoffversorgungen (Abbildung 4.18) zeigt, dass die maximale Produktivität bei einer kontinuierlichen Sauerstoffregelung auf 25 % pO_2 geringfügig höher war als bei der manuellen Regelung. Bei der manuellen Regelung schwankt der pO_2 zwischen 1,5 und 80 %. Die Auswirkung auf die Fermentation ist aber minimal, so dass nach 9 Tagen die gleich IA Endkonzentration erreicht wird. Der Zuluftausfall zeigt, dass die Produktivität infolge eines Ausfalls deutlich sinkt. Daher muss ein apparativer Ausfall der Zuluftversorgung vermieden werden. Zeigt die oszillierende Begasungsrate (100 s) weder Vor- noch Nachteile, so wirkt sich der einstündige Wechsel zwischen 5 und 45 % pO_2 negativ aus und sollte daher vermieden werden.

Durch die verschiedenen Ansätze der Sauerstoffversorgung kann in keinem Versuchsansatz das Einbrechen der Produktivität verhindert werden. Die Ursache für die Erniedrigung der IA-Produktion nach 2,5 und nach 4 Tagen bei der Referenz (Abbildung 4.13, Seite 69, IA mit Sauerstoffregelung) muss aufgeklärt werden. Eine mögliche Ursache könnte eine Limitierung von Medienbestandteilen, eine Produkthemmung oder eine Ansammlung hemmender Stoffe im Medium sein. Daher wird der Einfluss der Medienkomponenten

sowie die Fermentationsbrühe mittels HPLC genauer untersucht. Weiterhin werden Untersuchungen auf eine Produkthemmung durchgeführt.

4.2.3 Einfluss der Medienbestandteile

In diesem Kapitel wird der Einfluss verschiedener Medienkomponenten auf die IA-Produktion sowie auf die Morphologie des Pilzes näher untersucht.

4.2.3.1 Calcium

Laut Literatur beeinflusst die Morphologie des Pilzes nicht unerheblich die Itaconsäureproduktion (Gyamerah, 1995a). Speziell die Präsenz der Ca^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+} Ionen beeinflusst die Art der Sporenkeimung und die daraus folgende Erscheinungsform. Mit diesem Versuch soll festgestellt werden, wie sich eine Variation der CaCl_2 Konzentration auf die Morphologie und die Produktbildung von *A. terreus* LU02b auswirkt. Dazu wurden Fermentationen mit den Konzentrationen 0,2; 1; 5; 10 und 20 g/l CaCl_2 durchgeführt (Abbildung 4.19).

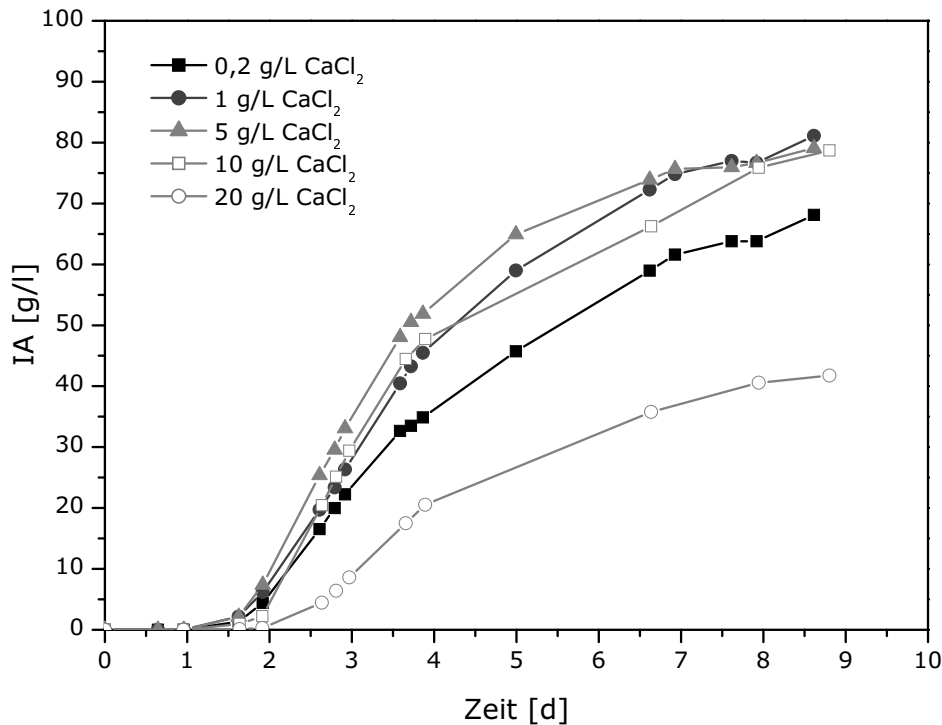


Abbildung 4.19: Variation der CaCl_2 Konzentration, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Besonders bei der niedrigen und der hohen Konzentration von Calcium ist die Wirkung auf die Produktbildung und die Morphologie ausgeprägt. Im Bereich von 1 bis 10 g/l CaCl_2 sind die Unterschiede bezüglich der Itaconsäureproduktion weniger stark ausgebildet. Die

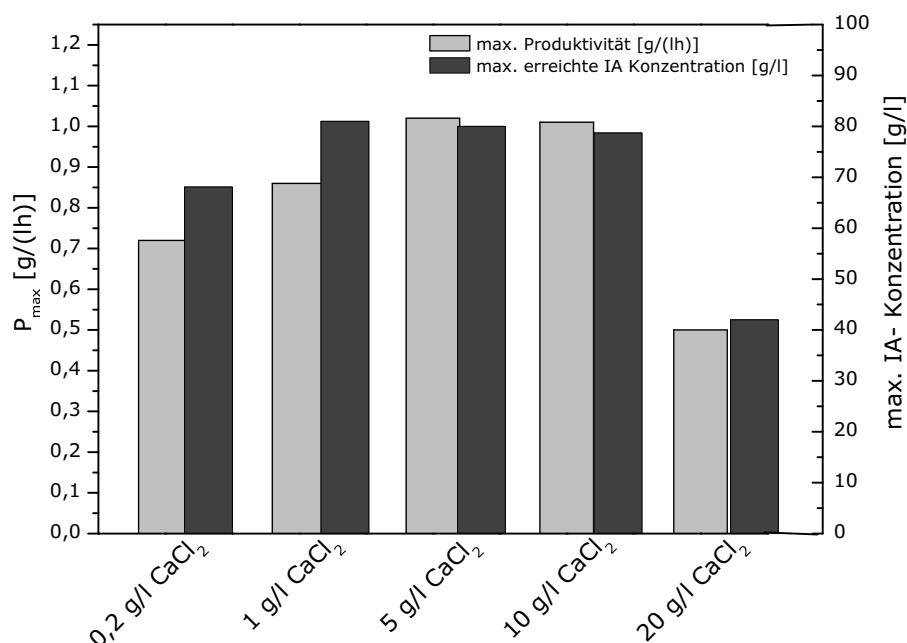


Abbildung 4.20: Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA-Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter bei verschiedenen CaCl_2 Konzentrationen, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt

Ergebnisse sprechen dafür, dass eine eingesetzte CaCl_2 -Konzentration in diesem Bereich für die Kultivierung im Fermenter vorteilhaft ist. Die Kultivierung mit 5 g/l CaCl_2 zeigt die beste Kombination von Produktivität und Endkonzentration (Abbildung 4.20). Diese Konzentration wird daher für alle weiteren Fermentationen verwendet.

Dass sich der Gehalt an Ca^{2+} -Ionen neben der Produktbildung auch auf die Morphologie auswirkt ist in der Abbildung 4.21 zu erkennen. Die Kultivierung mit 5 g/l CaCl_2 zeigt ein Wachstum in lockerer Pelletform. Der Rand der Pilzagglomerate ist lose und ausgefranst mit einzelnen, langen Myzelfäden. Mit sinkender CaCl_2 -Konzentration wird das Pellet kompakter. Das Myzel wächst dichter, mit kürzeren Hyphen, der Rand ist deutlich abgegrenzt. Bei Anhebung der Konzentration lockert die Pelletstruktur auf, das Myzel wächst weniger dicht und die einzelnen Hyphen zeigen verkürzte, knollenartige Formen. Bei Einsatz von 20 g/l CaCl_2 bildet der Pilz ein nahezu pseudo-, hefenartiges Wachstum.

Laut Literatur scheint für eine optimale IA-Produktion kleine Myzelpellets mit einem Durchmesser von 0,1 bis 0,5 mm und einem lockeren, ausgefranstem Rand am besten geeignet zu sein. Sie erzielen scheinbar die besten Produktionsraten und Produktausbeuten (Gyamerah, 1995a). Die Pilzmorphologie bei der optimalen Konzentration von 5 g/l CaCl_2 stimmt mit der von Gyamerah beschriebene Morphologie überein und zeigt im Vergleich zu festeren Pellets die beste IA-Produktion.

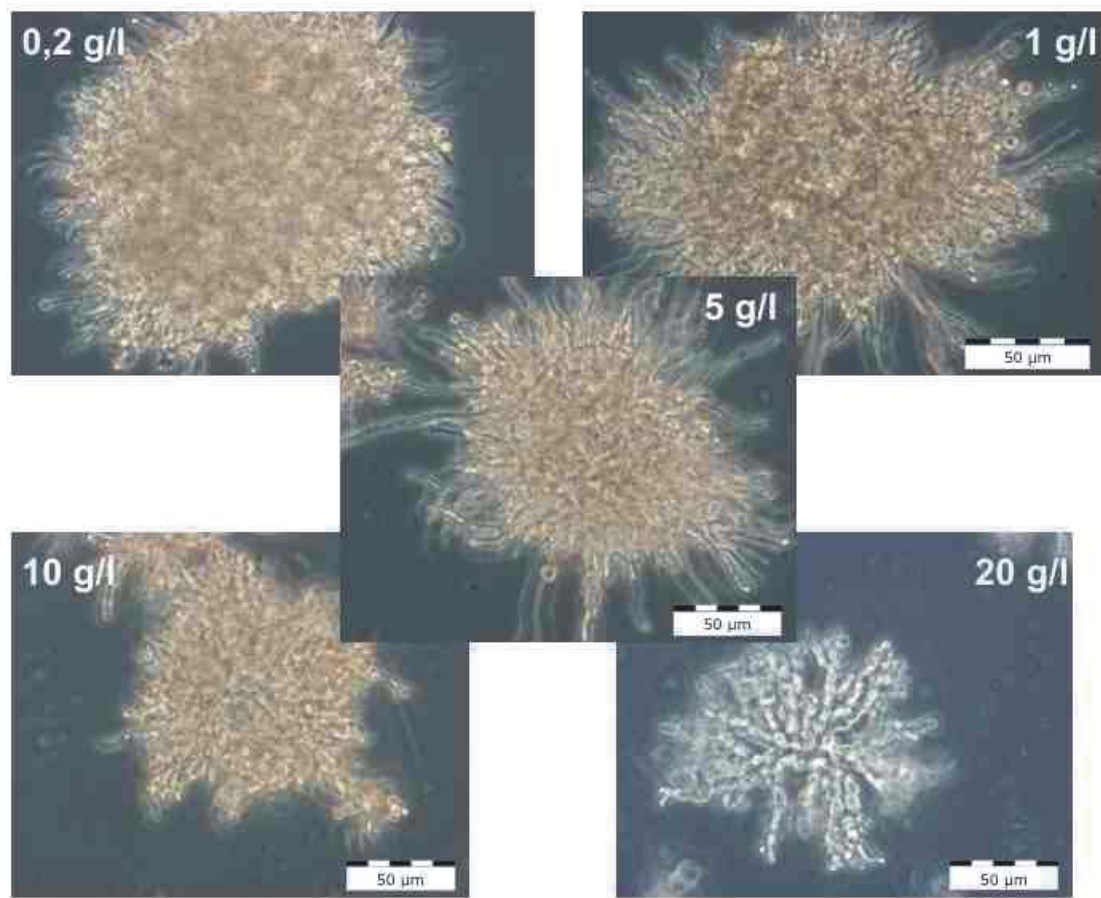


Abbildung 4.21: Übersicht der Pilzmorphologie von *Aspergillus terreus* LU02b mit verschiedenen CaCl_2 Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt ; 40fach vergrößert

4.2.3.2 Natrium

NaCl ist bisher kein Bestandteil des Standardproduktionsmedium (Tabelle 3.1, Seite 29). Trotzdem wird durch das Inokulum eine geringe Menge NaCl in die Kultivierung eingetragen (Kapitel 3.1.1, Seite 28). Die Sporen sind in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung suspendiert. Je nach Höhe der Sporenkonzentration werden ca. 5-10 ml Inokulum benötigt. Die Menge von NaCl, die auf diese Weise ins Medium gelangt beläuft sich auf unter 0,1 g/l. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zugabe von NaCl das Fermentationsergebnis beeinflusst. Untersucht werden die Konzentrationen 0,2; 0,5; 1 und 2 g/l NaCl.

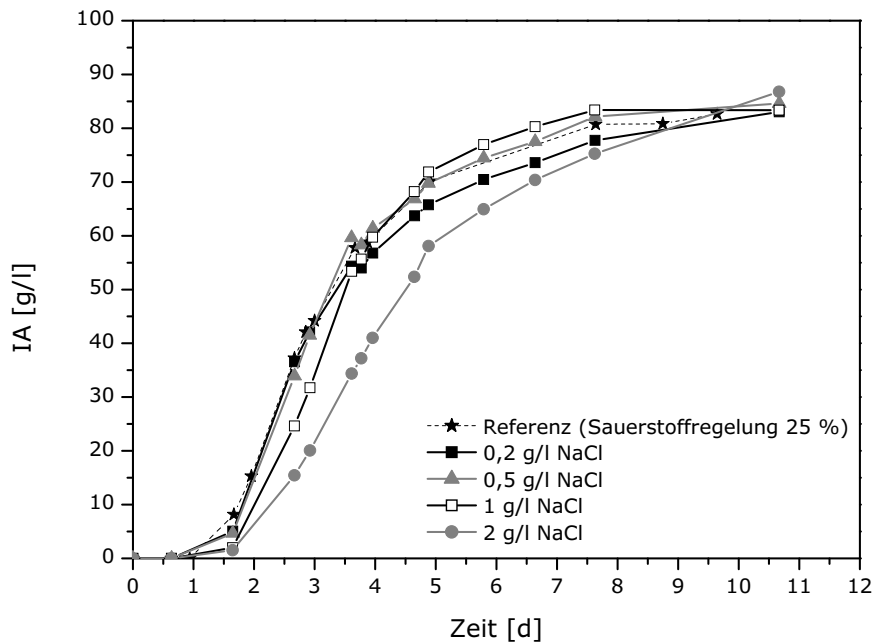


Abbildung 4.22: Variation der NaCl Konzentration, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Die Zugabe von 0,2 und 0,5 g/l NaCl zeigt keinen Einfluss auf den Fermentationsverlauf (Abbildung 4.22). Der Einsatz von 2 g/l NaCl bewirkt eine deutliche Abnahme der Produktivität. Bei der Zugabe von 1 g/l NaCl ist die Produktivität zwischen 1,5 und 2,5 Tagen geringer als bei der Referenz. Nach 2,5 Tagen verringert sich aber die Produktivität bei der Referenz, wohingegen sie bei dem Einsatz von 1 g/l NaCl zwischen 2,5 und 4 Tagen steigt. Nach 4 Tagen knickt aber unabhängig von der NaCl Zugabe die Produktivität. Die NaCl Zugabe hatte somit keinen Einfluss auf die Produktivitätsabnahme nach 4 Tagen. Der Verlauf zwischen 2 und 4 Tagen ist dennoch sehr interessant und bedarf weiteren Untersuchungen.

Ein Vergleich der maximalen Produktivitäten (Abbildung 4.23) zeigt, dass NaCl diese und die erreichte Endkonzentration nicht beeinflusst. Eine Menge von 2 g/l wirkt sich negativ auf die Produktivität aus.

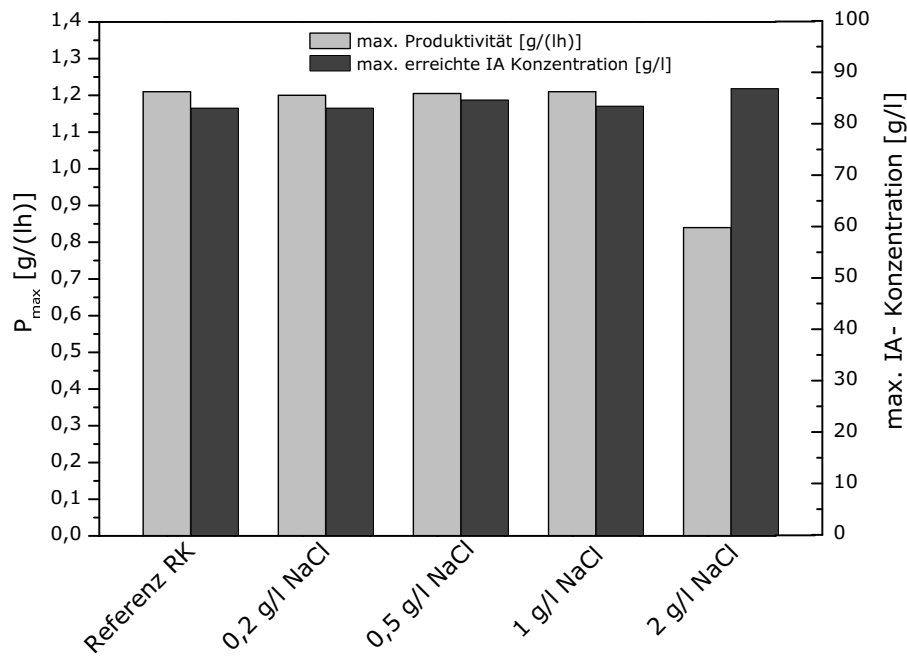


Abbildung 4.23: Übersicht der maximalen Produktivitäten und der maximal produzierten IA-Konzentrationen bei verschiedenen NaCl Konzentrationen, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 unregelt

4.2.3.3 Phosphat, Ammonium, Nitrat

Bei der Fermentation (Abbildung 4.13, Seite 69, mit Sauerstoffregelung auf 25 %, Referenz) wurde mittels HPLC die Ammonium- und die Nitratkonzentration während der Kultivierung gemessen (Abbildung 4.24). Die Ammoniumkonzentration sinkt während der Wachstumsphase um 45 % von 740 mg/l auf 405 mg/l und bleibt bis zum Kultivierungsende, während der Produktionsphase, nahezu konstant auf diesem Niveau. Während der Wachstumsphase senkt der Pilz den pH-Wert des Kultivierungsmediums von 3,1 auf ungefähr 1,8 und hält diesen niedrigen pH-Wert bis zum Kultivierungsende bei.

Die Nitratkonzentration bleibt während der Wachstumsphase konstant und nimmt während der Produktionsphase, pH-Wert ist konstant auf 1,8, um 49 % auf 1,4 g/l ab. Dies zeigt, dass während der fermentativen IA-Herstellung unter Standardbedingungen im 1,5 l Rührreaktor keine Stickstofflimitierung vorliegt. Nach 2,5 Tagen Kultivierungsdauer wird eine molare Ausbeute von 80 % erreicht, die nach 5 Tagen auf 75 % abnimmt.

Bei der Kultivierung von *A. terreus* wird das Wachstum durch die Phosphatkonzentration im Medium limitiert (Welter, 2000). Die IA-Produktion beginnt am Ende der Wachstumsphase, ungefähr 35,6 % des Wachstums findet während der IA-Produktionsphase statt (Gyamerah, 1995b). Bei der Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter unter Standardbedingungen konnte dies anhand der Phosphatmessung bestätigt werden (Abbildung 4.25).

Die Phosphatkonzentration sinkt während der Wachstumsphase von ca. 62 auf 3,36 mg/l. Nach 2,6 Tagen nimmt die Phosphatkonzentration wieder auf 5,6 mg/l zu. 4,5 h später und während der gesamten weiteren Fermentation ist kein Phosphat im Kulturüberstand

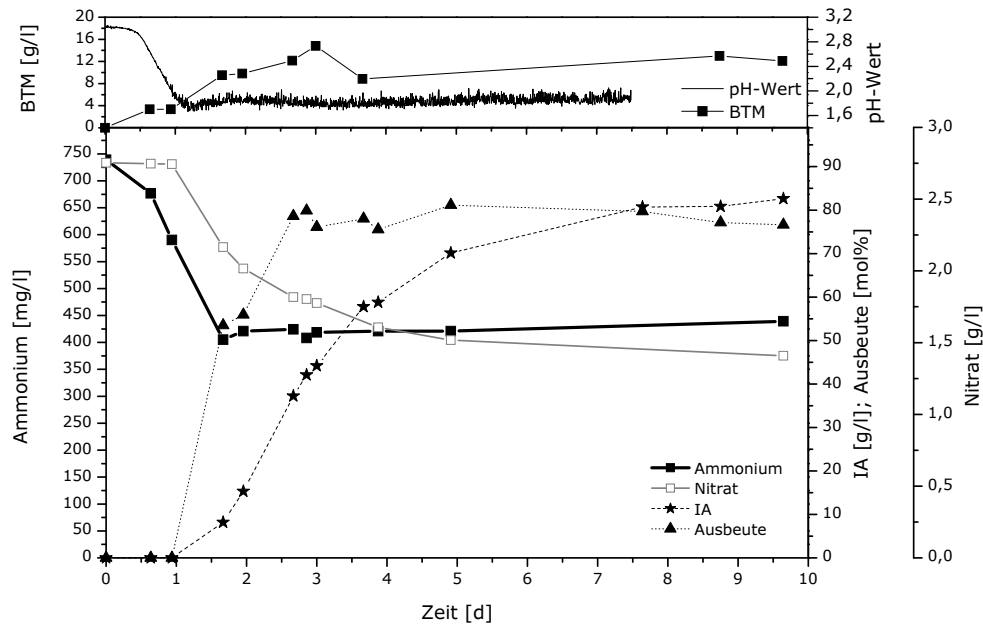


Abbildung 4.24: Ammonium- und Nitratkonzentration der Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung (25 %), Referenz, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

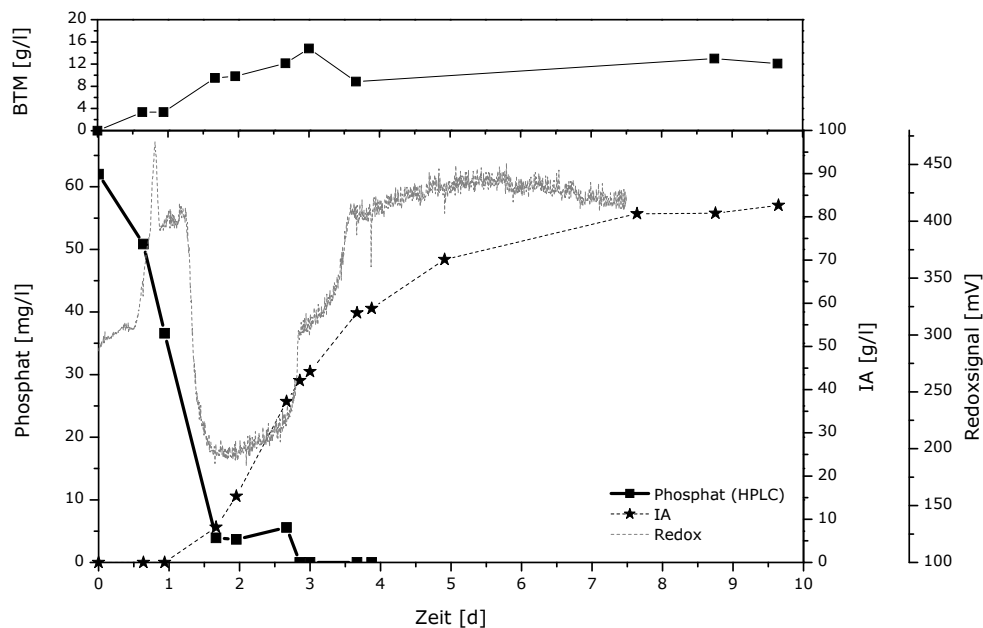


Abbildung 4.25: Phosphat- und Nitratkonzentration der Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter mit Sauerstoffregelung (25 %), Referenz, Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

messbar. Es ist auffällig, dass auch diese Änderung genau zu dem Zeitpunkt der Hysterese des Redoxsignals und der IA-Produktivitätsabnahme auftritt. Im Kapitel 4.1.2.3, Seite 59 wird mit einer erhöhten Startphosphatkonzentration eine bessere IA-Produktion erreicht. Trotz dieser erhöhten Konzentration, 0,1 g/l statt 0,04 g/l KH_2PO_4 , ist nach 2,8 Tagen Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter kein Phosphat messbar.

Eine These die untersucht werden soll ist, dass die Zelle eine Mindestkonzentration an Phosphat benötigt. Ist diese unterschritten werden Phosphatasen freigesetzt um neues Phosphat der Zelle zur Verfügung zu stellen (Liedtke and Ohmann, 1969). Dies würde bedeuten, dass der Pilz seine Energie für andere Synthesen als zur reinen IA-Produktion benötigt und daher die Produktivität zu diesem Zeitpunkt sinkt. Um zu überprüfen, ob eine mindest Phosphatkonzentration im Medium für die Produktion, trotz Wachstumslimitierung, vorliegen muss, wurde ab 40 h (Redoxsignal durchläuft das Minimum, Produktivität ist maximal, 3,36 mg/l Phosphat im Medium messbar) täglich 3,35 mg/l Phosphat zugegeben (Abbildung 4.26). Die Fermentation der Abbildung 4.13, Seite 69,

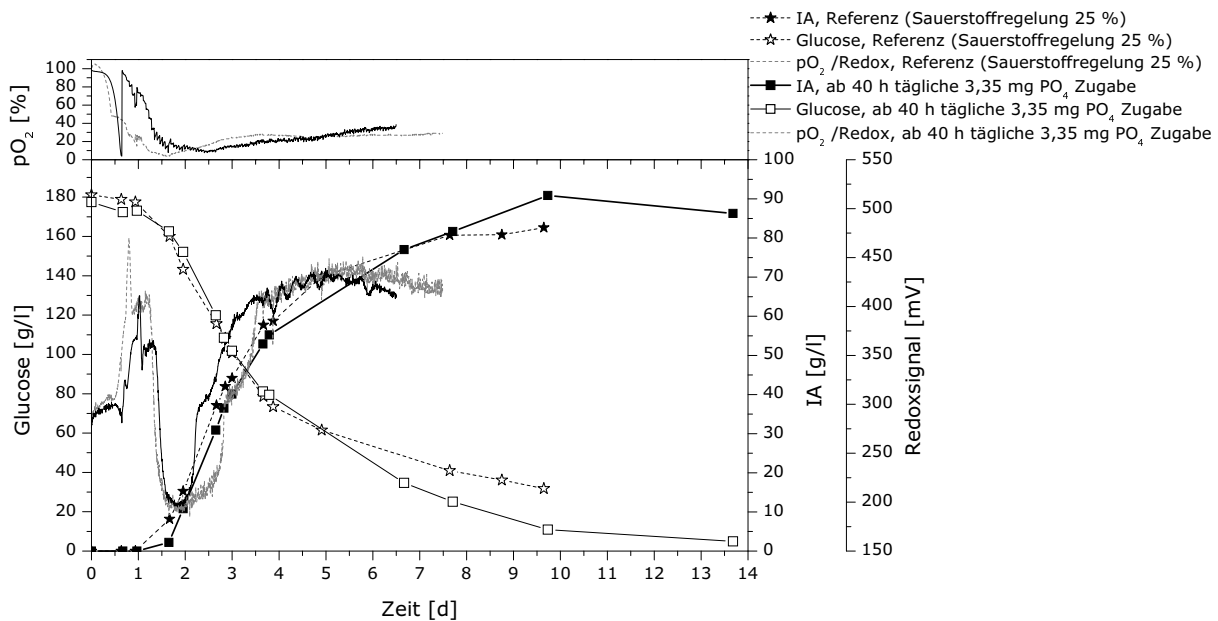


Abbildung 4.26: IA-Produktion von *A. terreus* LU02b im 1,5 l Glasreaktor, Standardproduktionsmedium und täglicher Zugabe von 3,35 mg/l PO₄, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

mit Sauerstoffregelung auf 25 %, dient als Referenz. Während des Versuchsansatzes zur Phosphatzugabe wurden parallel zwei Fermentationen durchgeführt, bei denen jeweils ab 40 Stunden täglich Phosphat zugegeben wurde. Die tägliche Phosphat Zugabe zeigt allerdings keine Auswirkung auf das Wachstum, die IA-Produktivität und auf das Redoxpotenzial. Die Kurven entsprechen denen der Referenz. Die Morphologie des Myzels gleicht der einer Referenz und durch die Zugabe von 3,35 mg Phosphat setzte kein erneutes Biomassenwachstum ein.

Eine erhöhte Phosphatkonzentration zu Beginn der Kultivierung (Kapital 4.1.2.3) bewirkt eine bessere IA-Produktion. Eine tägliche Phosphatzugabe von 3,35 mg/l zeigt hingegen weder einen positiven noch negativen Einfluss auf die IA-Produktion.

4.2.3.4 Einfluss von Eisen und Cystein

Das Enzym Aconitase, das die Vorstufe cis-Aconitsäure synthetisiert, besitzt im aktiven Zentrum ein Eisen-Schwefel Cluster. Es benötigt für seine Aktivität Eisen als Co-Faktor und bindet zusammen mit Seitenketten (polaren Aminosäuren, hauptsächlich Arginin Resten) das Substrat Citrat. Außerdem wird das Enzym durch Bestandteile die Eisen komplexieren inhibiert. Wenn der Eisengehalt in der Zelle sinkt, verliert die Aconitase das Eisen-Schwefel Cluster und somit seine Aktivität. Es übernimmt als „iron response protein“ bindendes Enzym eine neue Aufgabe. Es bindet an der mRNA von Transferrin dessen Genprodukt Eisen aus der Umgebung aufnimmt und, wenn ausreichend Eisen in der Zelle vorhanden ist, bildet sich erneut das Eisen-Schwefel Cluster aus (Kapitel 2.2.2.1, Seite 9). In der Literatur ist weiterhin zu finden, dass verschiedene Konzentrationen an Eisen die IA-Produktion bei *Aspergillus terreus* NRRL 1960 stark beeinflussen (Batti and Schweiger, 1963). Daher soll zum einen der Einfluss von dreiwertigen und zweiwertigen Eisen untersucht werden und zum anderen die Zugabe von Cystein als „reducing agent“ (Kapitel 2.2.2.1, Seite 9), um das Enzym zu stabilisieren.

- **Eisenquelle**

Es wurden drei Fermentationen, Fermenter 1 und 2 mit Fe(II)SO_4 und Fermenter 3 mit Fe(III)Cl_3 , parallel durchgeführt und vergleichend zur Referenz (Sauerstoffregulierung 25 %, Fe(III)Cl_3) dargestellt (Abbildung 4.27). Die eingesetzte Eisenkonzentration beträgt jeweils 0,34 mg/l. Bei den Fermentern 1 und 2 werden nach 40 Stunden Kultivierung erneut Spurenelemente (ZnSO_4 , CuSO_4 und FeSO_4) zugegeben.

Bei den drei parallel durchgeführten Fermentationen ist kein Unterschied in den Kultivierungsverläufen vorhanden. Die unterschiedlichen Eisenquellen sowie die Spurenelementzugabe nach 40 Stunden wirken sich weder positiv noch negativ auf die IA-Produktion, das Wachstum sowie auf den Glucoseverbrauch aus.

Im Vergleich zur Referenz, die unter vergleichbaren Bedingungen wie im Fermenter 3 durchgeführt wurde, ist die lag-Phase bis zu Beginn der Produktionsphase etwas verzögert. Dies könnte darin begründet sein, dass die Sporenkeimung etwas verzögert war. In der Produktivität ist kein signifikanter Unterschied vorhanden. Unabhängig von den Fermentationsbedingungen knickt nach 2,5 und 4 Tagen die Produktivität ein und ab 7 Tagen werden bis zum Fermentationsende vergleichbare IA-Konzentrationen erreicht.

- **Zugabe von Eisen in Verbindung mit Cystein**

Die Hypothese, dass die IA-Produktivität nach 2,5 und 4 Tagen sinkt, da die Aconitase an Aktivität verliert, wird untersucht indem durch die Zugabe von Cystein und Eisen das Enzym stabilisiert werden soll. Es wurden drei Fermentationen, Fermenter 2-4 (F2, F3 und F4) mit Fe(II)SO_4 durchgeführt, bei denen zu Beginn der Kultivierung sowie nach 2,5 Tagen verschiedene Cystein-Konzentrationen zugegeben wurden (Abbildung 4.28). Bei der Zugabe von 0,02 g/l Cystein (Fermenter 2) ist zu Beginn der Fermentation keine Abweichung zur Referenz vorhanden. Nach 4 Tagen sinkt die IA-Produktivität ein wenig stärker als bei der Referenz und nach 13,5 Tagen wurden 81 g/l IA hergestellt. Diese geringe Cystein-Konzentration scheint,

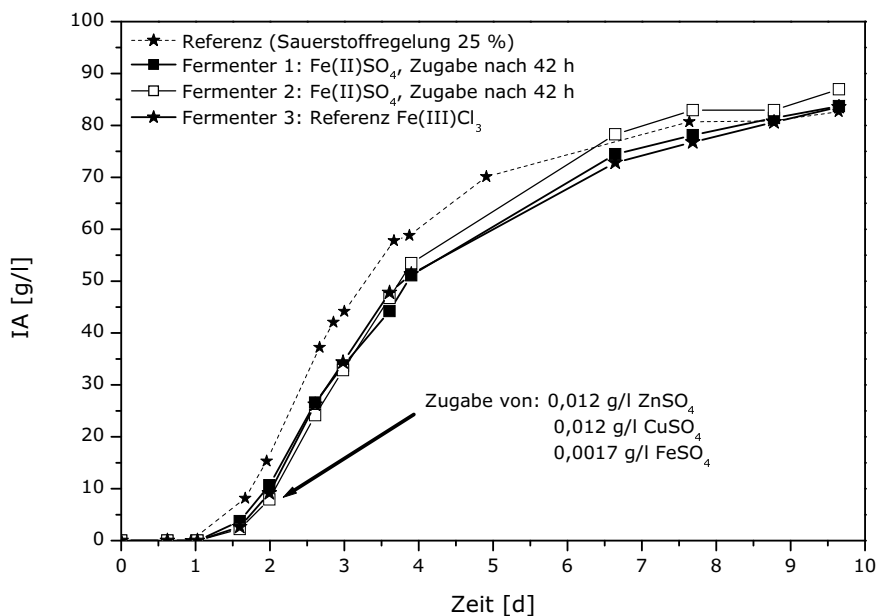


Abbildung 4.27: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von *Aspergillus terreus* LU02b, Vergleich zwischen FeCl₃ und FeSO₄, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

trotz der erneuten Zugabe nach 2,5 Tagen, keinen Einfluss auf die IA-Herstellung zu besitzen.

Bei der Zugabe von 2 g/l Cystein ist die lag-Phase bis zur IA-Produktion einen Tag verzögert. Die Produktivität unterscheidet sich bis zum 4. Tag der Fermentation nicht von der Referenz, sinkt dann aber stärker und nach 13,5 Tagen Kultivierung wird eine Endkonzentration von 75 g/l IA produziert. Diese Konzentrationszugabe zu Beginn der Fermentation scheint sich somit negativ auf die fermentative IA-Herstellung auszuwirken.

Bei der Zugabe von 0,2 g/l Cystein hingegen ist ein abweichender Kultivierungsverlauf erkennbar. Die IA-Produktion beginnt einen Tag später, als bei der Referenz, da die Cystein Zugabe zu Beginn der Fermentation vermutlich die Sporenkeimung beeinflusst. Dies ist an der Gelöstsauerstoffpartialdruck Kurve ersichtlich (Abbildung 4.29). Eine erneute Zugabe von Cystein und Eisen erfolgt nach 2,5 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt durchläuft das Redoxsignal das Minimum und wird durch die Zugabe kurzfristig ungefähr um 100 mV gesenkt. Bei der Referenz durchläuft das Redoxsignal die Hysterese und knickt nach 4 Tagen auf einen konstanten Wert. Bei der Cystein Zugabe hingegen bleibt das Redoxsignal bis zum 5. Tag auf dem niedrigen Niveau, steigt dann langsam und erreichte nach ungefähr 6 Tagen einen konstanten Wert. In der IA-Produktionskurve ist kein auffälliges Einknicken der Produktivität erkennbar. Nach 13,5 Tagen wird eine Endkonzentration von 86 g/l erreicht. Zu diesem Zeitpunkt sind lediglich 6 g/l Glucose vorhanden. Jedoch ist die Ausbeute mit 70 mol% schlechter als bei der Referenz, mit 80 mol% (Kapitel 4.2.1.1, Seite 67).

Die Cystein Zugabe wirkte sich auch auf die Morphologie des Pilzes aus (Abbil-

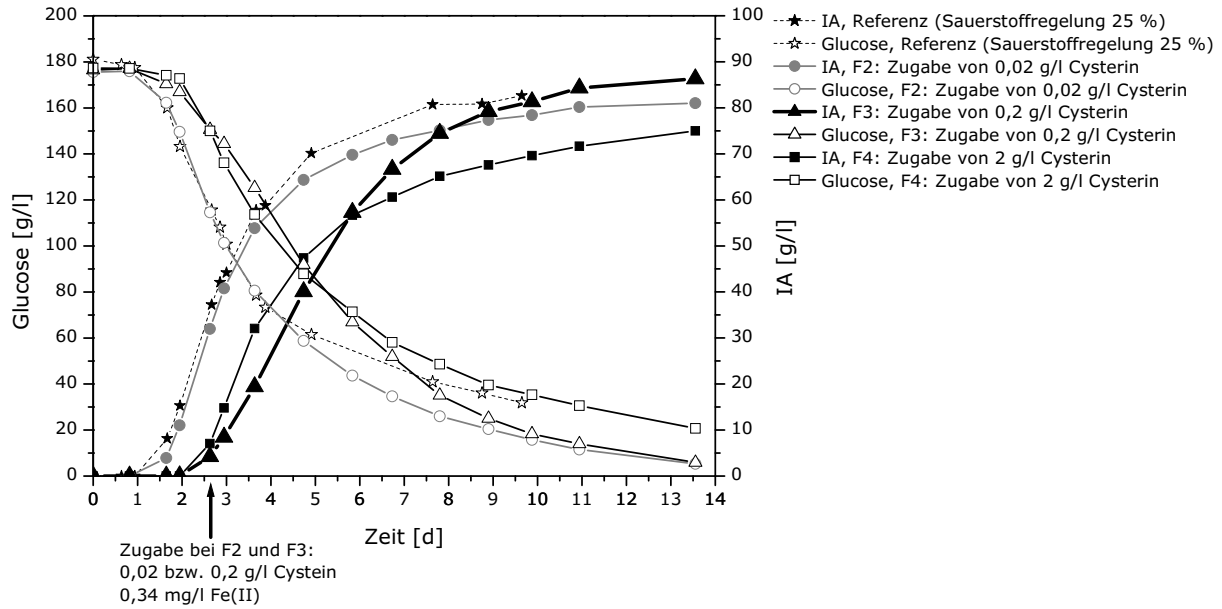


Abbildung 4.28: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von *Aspergillus terreus* LU02b, Zusatz verschiedener Cystein Konzentrationen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

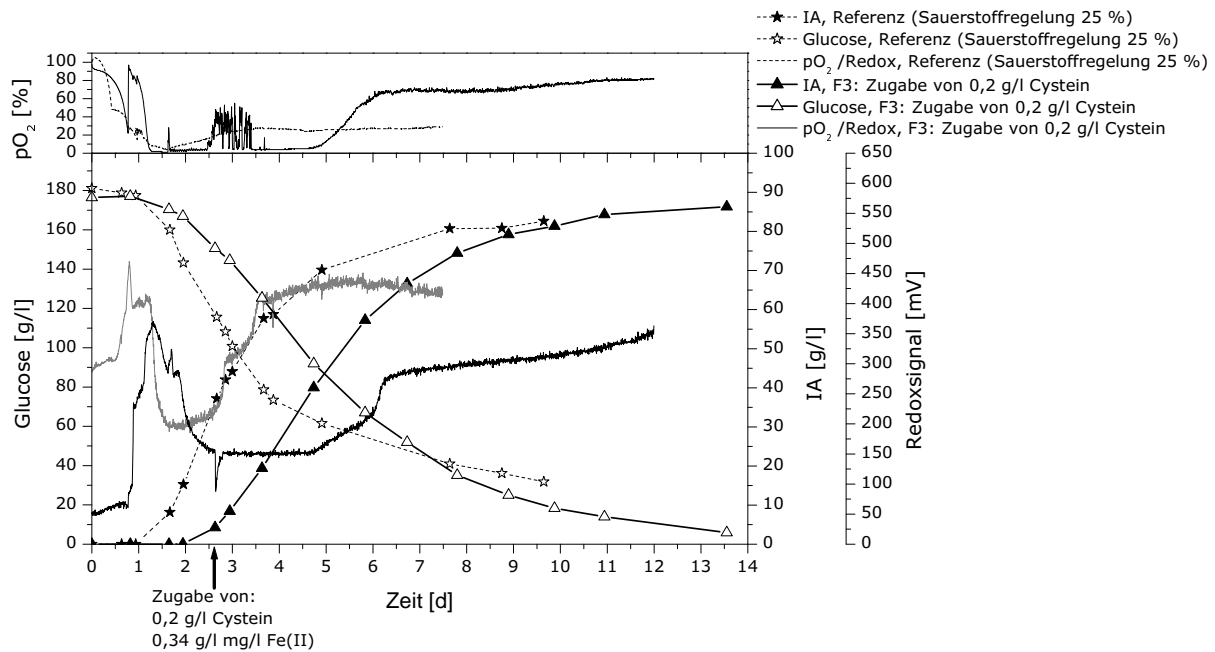


Abbildung 4.29: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von *Aspergillus terreus* LU02b, Zusatz von 0,2 g/l Cystein, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

dung 4.30). Die Kultivierung mit 0,02 g/l Cystein zeigt ein Wachstum in lockerer Pelletform, vergleichend zur Referenz. Der Rand der Pilzagglomeration ist lose und ausgefranst mit einzelnen Myzelfäden. Bei der Zugabe von 0,2 g/l Cystein ist hingegen keine Zusammenlagerung zu lockeren, ausgefranst Pellets mit Durchmessern von ungefähr 0,1 mm vorhanden. Die Biomasse zeigt sich vielmehr als lockeres, freies Myzel, mit langen, dünnen, verzweigten Hyphen. Bei der Zugabe von 2 g/l Cystein, was sich negativ auf die IA-Produktion auswirkte, ist eine Zusammenlagerung der Hyphen zu Agglomeraten vorhanden. Im Gegensatz zur Referenz waren die einzelnen Hyphen dicker und besaßen viele Wucherungen.

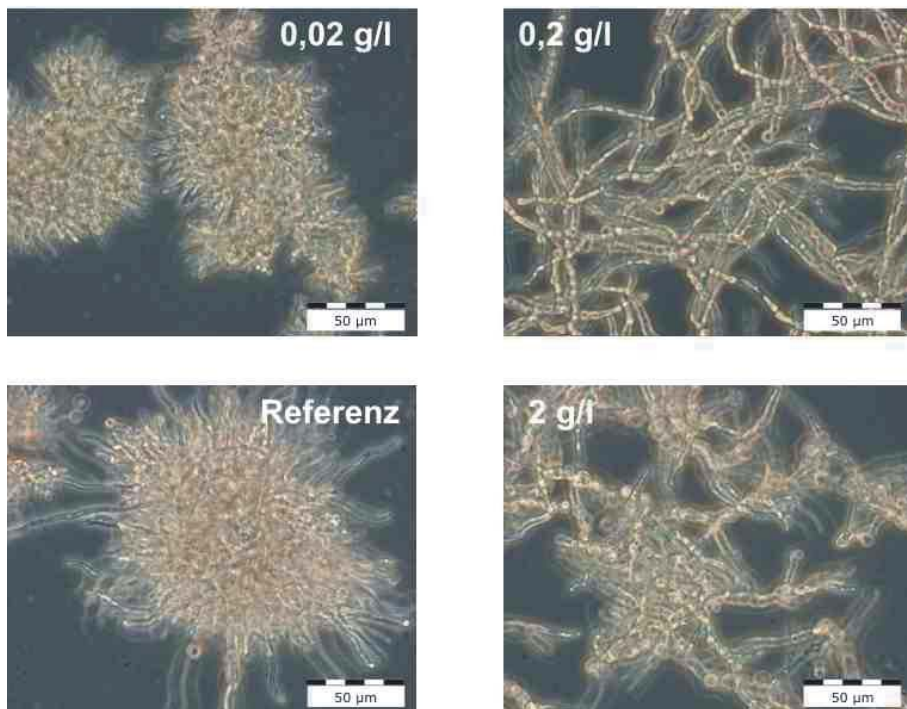


Abbildung 4.30: Übersicht der Pilzmorphologie von *Aspergillus terreus* LU02b mit verschiedenen Cystein Konzentrationen im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt; 40fach vergrößert

4.2.4 Diskussion: Kultivierung im 1,5 l Rührreaktor, Einfluss der Medienbestandteile auf die IA-Produktion

Bei einer kontinuierlichen und gleichmäßigen Sauerstoffversorgung ist eine stabile und reproduzierbare fermentative IA-Herstellung im 1 l Maßstab etabliert. Auswirkungen von verschiedenen Kultivierungsvariationen können somit erkannt und analysiert werden. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 20 g/l CaCl_2 wird die Morphologie und auch die IA-Produktion stark beeinflusst. Bei einer Konzentration von 5 g/l bilden sich lockere Pellets aus. Der Rand der Pilzagglomerate (mit einem Durchmesser von ungefähr 0,1 mm) ist lose und ausgefranst mit einzelnen, langen Myzelfäden. Laut Literatur scheint diese

Morphologieform für die optimale IA-Produktion am besten geeignet zu sein. Sie erzielt scheinbar die beste Produktionsrate und Produktausbeute (Gyamerah, 1995a). Dies konnte mit dem Eigenisolat *Aspergillus terreus* LU02b bestätigt werden, da er mit dieser Calciumkonzentration und dieser Myzelform die beste IA-Produktion zeigt. Daher wird in allen Versuchen eine Konzentration von 5 g/l CaCl_2 eingesetzt.

Der Zusatz von 2 g/l NaCl wirkt sich negativ auf die Produktivität aus. Kleinere NaCl Konzentrationen wirken sich hingegen weder positiv noch negativ auf die maximale Produktivität und die Endkonzentration aus. Die Verläufe mit 0,2 und 0,5 g/l NaCl entsprechen denen der Referenz, wohingegen der Zusatz von 1 g/l einen abweichenden IA-Produktionsverlauf zwischen 2 und 4 Tagen aufweist. Das Redoxsignal verbleibt im Vergleich zur Referenz die doppelte Kultivierungszeit auf dem niedrigen Niveau. Nach 2,5 Tagen sinkt die Produktivität nicht, wie die der Referenz, sondern wird erhöht. In wie weit NaCl diesen Effekt beeinflusst kann noch nicht geklärt werden.

Aufnahme und Abgabe von Ionen (z.B. Na^+ , K^+), Substraten und Metaboliten in die Zelle und aus der Zelle heraus, sind unter anderem an spezielle Transportsysteme in der Cytoplasmamembran gebunden. Es handelt sich dabei um Membranproteine, deren Mechanismus in der Regel vom vorherrschenden biochemischen Potenzial abhängig ist bzw. dieses durch die Verlagerung von Ionen verändert (Schlegel, 1985). Es ist unbekannt auf welche Weise die Aufnahme der Glucose und Salze aus dem Medium und die Abgabe der IA vom Zellinneren ins umgebende Medium zum Verlauf des Redoxpotenzial beitragen. Anscheinend ist nach dreitägiger Kultivierung eine Art Ungleichgewicht erreicht, welches sich vermutlich destabilisierend auf potenzialabhängige Transportvorgänge auswirkt und so die Durchlässigkeit der Cytoplasmamembran verändert. Infolge gestörter Ionengradienten könnten enzymatische Prozesse gehemmt werden, die schließlich zu einer Reduktion der Itaconsäureproduktion führen bzw. allgemein den Zellstoffwechsel beeinträchtigen.

Im folgenden Abschnitt werden die Nebenprodukte genauer untersucht, was eventuell einen Hinweis liefern könnte. Da der Effekt bei dem Zusatz von 1 g/l NaCl nicht geklärt werden kann und die Produktivität nicht erhöht, bzw. die IA-Produktion zeitlich verlängert werden konnte, so dass am Kultivierungsende kein Unterschied in der Endkonzentration im Vergleich zur Referenz vorhanden war, wird bei den weiteren Untersuchungen dem Medium kein zusätzliches Natrium beigeetzt.

Unter Standardbedingungen liegt keine Stickstofflimitierung vor. Während der Wachstumsphase werden ungefähr 50 % des eingesetzten Ammoniums und während der Produktionsphase ungefähr 50 % des eingesetzten Nitrats verbraucht. Hingegen ist die IA-Produktion wachstumsentkoppelt durch eine Phosphatlimitierung. Eine erhöhte Phosphatanfangskonzentration von 0,1 g/l KH_2PO_4 wirkt sich positiv auf die fermentative IA-Herstellung aus. Bei der Untersuchung des Phosphatverlaufes im Rührreaktor fällt auf, dass in der Phase maximaler Produktivität der Phosphatgehalt im Medium zunimmt. Zu dem Zeitpunkt wo die Produktivität sinkt, nach 2,5 Tagen, und im weiteren Fermentationsverlauf ist kein Phosphat messbar. Eine tägliche Zudosage von 3,35 mg/l KH_2PO_4 , ab 40 Stunden, wirkt sich weder positiv noch negativ auf den IA-Produktionsverlauf aus. Die Hypothese, dass die Zelle eine mindest Phosphatkonzentration benötigt kann durch diesen Versuch weder bestätigt noch widerlegt werden. Eventuell erfolgte die Phosphatzugabe nicht zum richtigen Zeitpunkt und nicht in der richtigen Konzentration, so dass der Pilz schon auf einen anderen Stoffwechselweg umgeschaltet hat. Oder das freie Phosphat wird

direkt nach der Zugabe an andere Elemente oder an die Myzeloberfläche gebunden und steht der Zelle somit nicht frei zur Verfügung.

Laut Literatur spielt die Eisenversorgung bei der IA-Herstellung eine wesentliche Rolle (Batti and Schweiger, 1963; Glusker, 1971). Bei dem Einsatz von Konzentration ab 1 mg/l Eisen wird die IA-Produktion von *A. terreus* NRRL 1960 negativ beeinflusst. Bei *A. terreus* NRRL 1963 zeigte eine Konzentration von 0,34 mg/l Eisen die beste IA-Produktion, wohingegen sich 0,68 mg/l Eisen negativ auswirken (Welter, 2000). Ausgehend von dieser Konzentration (0,34 mg/l) wird bei *A. terreus* LU02b gezeigt, dass die IA-Produktion unabhängig von der Eisenquelle Fe(II)SO_4 und Fe(III)Cl_3 ist. Auch eine erneute Zugabe von 0,34 mg/l Eisen nach 40 Stunden Kultivierungsdauer beeinflusst den Fermentationsverlauf weder positiv noch negativ.

Bei der Fermentation ist eine ausreichende, kontinuierliche Sauerstoffversorgung essenziell. Durch die Begasung, bis zu 1 v/vm, wird das Eisen oxidiert, so dass vermutlich während der aktiven Begasungsphase das Eisen als dreiwertiges Eisen vorliegt. Da laut Literatur das Eisen reduziert vorliegen muss, um enzymatisch wirksam zu sein (Eisen-Schwefel-Cluster der Aconitase) wird Cystein als „reducing agent“ eingesetzt. Die primäre Aufgabe des Cysteins ist, das Eisen reduziert zu halten (Bruchmann, 1963). Geringe Konzentrationen (0,02 g/l) zeigen keinen Einfluss und eine Konzentration von 2 g/l Cystein zu Fermentationsbeginn beeinflusst die IA-Herstellung negativ. Bei der Zugabe von 0,2 g/l Cystein ist keine Zusammenlagerung zu lockeren, ausgefransten Pellets mit Durchmesser von ungefähr 0,1 mm, vorhanden wie bei der Referenz. Es zeigt sich vielmehr als lockeres, freies Myzel, mit langen, dünnen, verzweigten Hyphen. Auffällig im Vergleich zur Referenz ist, dass das Redoxsignal während der Produktionsphase konstant auf einen niedrigen Level verbleibt und die Produktivität nicht nach 2,5 und 4 Tagen einknickt. Die Zugabe von Cystein wirkt sich auf die Produktion aus. Jedoch ist die maximale Produktivität geringer als bei der Referenz und die erreichte Endkonzentration ist nicht höher. Da die Produktivität nicht knickt, ist zu vermuten, dass durch das Cystein die Enzymaktivität beeinflusst wird. Bei den Verläufen der Nebenprodukte (HPLC Messung) können deutliche Unterschiede zu den Verläufen einer Referenz Kultivierung festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde die Nebenproduktbildung im folgenden Abschnitt genauer untersucht.

4.2.5 Untersuchung zur Produktbildung

In diesem Kapitel wird zum einen das Nebenproduktspektrum qualitativ und quantitativ untersucht und zum zweiten werden Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluss über eine möglicherweise vorliegende Produkthemmung geben sollen.

4.2.5.1 Nebenproduktbildung

- **Qualitative- und quantitative Bestimmung der Nebenprodukte**

Bei der Kultivierung von *A. terreus* LU02b werden während der Kultivierung Nebenprodukte hergestellt. Eine Untersuchung des Kulturüberstandes des Schüttelkolbenversuches (Abbildung 4.1, Seite 54, *A. terreus* LU02b) wurde von dem Pro-

jektpartner der UFZ Leipzig-Halle GmbH durchgeführt. Folgende Produkte konnten mittels Ionenaustauschchromatographie nachgewiesen werden:

- Pyruvat (0,2 g/l)
- Äpfelsäure (0,3 g/l)
- Itaconsäure (30 g/l)
- Ketoglutarsäure
- Citronensäure (0,4 g/l)

Untersuchungen mittels Ionenchromatographie-Massenspektroskopie (IC-MS) ergeben die in Tabelle 4.1 dargestellten Molekulargewichte und die zugeordneten Substanzen. Es werden größere Mengen an Gluconsäure, im Bereich von 5 g/l, gefunden. Die Konzentration von Fumarsäure liegt deutlich unter 1 g/l. Bei der Ionenaustauschchromatographie und bei der IC-MS werden Peaks gefunden, die keiner Substanz eindeutig zugeordnet werden können.

Tabelle 4.1: Ionenchromatographie-Massenspektroskopie des Kulturüberstandes einer Kultivierung mit *A. terreus* LU02b

Molekulargewichte [Mol.gew. – 1]	Substanz
78,9	Phosphat
85,1	- nicht eindeutig zuzuordnen -
97,2	Sulfat
101	- nicht eindeutig zuzuordnen -
114,9	Fumarsäure
129	Itaconsäure
133	Äpfelsäure
145,1	Ketoglutarsäure
177	- nicht eindeutig zuzuordnen -
195,1	Gluconsäure

Diese Analyse bestätigt die von mir identifizierten Nebenprodukte, basierend auf Untersuchungen mittels HPLC (Standardaddition, Säule: BioRad HPX87H, 23 °C, 0,6 ml/min, 5 mM H₂SO₄), Ketoglutarsäure und Äpfelsäure. Ausgehend von der Analyse des UFZ werden die Kulturüberstände erneut mittels HPLC ausgewertet. Fumarsäure und Äpfelsäure werden unter diesen Bedingungen Basislinien getrennt und können quantitativ ausgewertet werden. Der Peak der Citronensäure (Tabelle 4.2, Abbildung 4.31) kommt kurz vor dem Peak der Ketoglutarsäure. Gluconsäure und Pyruvat kommen kurz nach der Ketoglutarsäure. Überschreitet die Konzentration der Ketoglutarsäure eine bestimmte Konzentration, werden die Peaks der Citronensäure, Gluconsäure und des Pyruvates nicht mehr vom Ketoglutarsäure Peak getrennt und können weder qualitativ noch quantitativ ausgewertet werden.

Bei den Kultivierungen mit täglicher Phosphatzugabe (Abbildung 4.26, Seite 80) sowie bei der Fermentation mit Zuluftausfall (Abbildung 4.14, Seite 70) werden die

Tabelle 4.2: Retentionszeiten von Itaconsäure und der gebildeten Nebenprodukte bei der Kultivierung von *A. terreus* LU02b; HPLC: Säule - BioRad HPX87H, Fluss 0,6 ml/min, T 23 °C, Laufmittel 5 mM H₂SO₄

Substanz	Retentionszeit [min]
Unbekannt 1	7,33
Citronensäure	7,975
Ketoglutasäure	8,296
Gluconsäure	8,588
Pyruvat	9,051
Äpfelsäure	9,562
Unbekannt 2	10,622
Itaconsäure	13,282
Fumarsäure	15,919

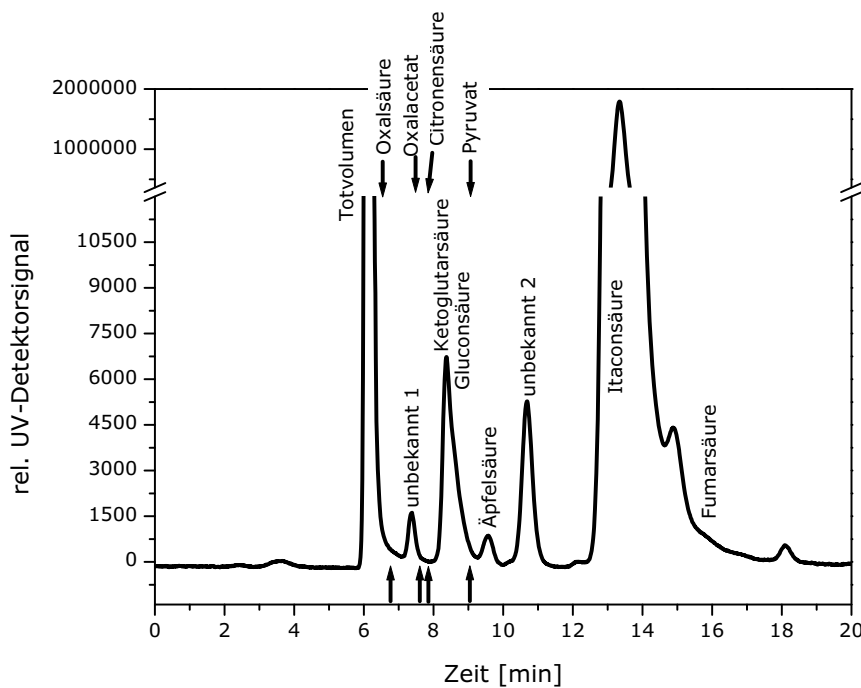


Abbildung 4.31: UV-Chromatogramm (Verdünnung 1:100) einer Standardkultivierungen von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter nach 8 Tagen Kultivierungsdauer, 33 °C, Start pH 3,1 unregelt

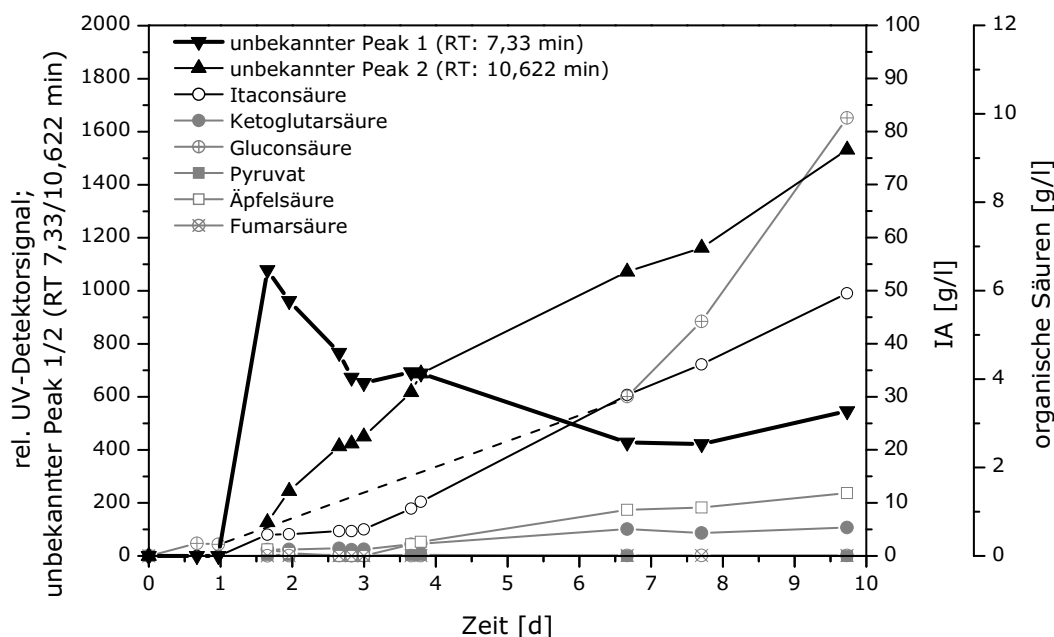


Abbildung 4.32: Zeitlicher Verlauf der Nebenprodukte (Verdünnung 1:100) von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter bei der Kultivierung mit Zuluftausfall nach 1,5 Tagen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Nebenprodukte so weit wie möglich quantitativ ausgewertet.

Infolge des Zuluftausfalls nach 1,5 Tagen (Abbildung 4.32) setzt die IA-Produktion aus und startet verlangsamt 36 Stunden nach dem Ausfall. Während der gesamten Kultivierung werden 1,5 g/l Äpfelsäure, 0,6 g/l Ketoglutarsäure sowie deutlich unter 0,1 g/l Fumarsäure gebildet. Dagegen werden 10 g/l Gluconsäure gebildet. Bei einer Unterbrechung der Sauerstoffversorgung ändert sich die Morphologie des Pilzes. Die IA-Produktion ist verzögert und der Pilz scheint vermehrt Gluconsäure zu produzieren. Überschreitet die Gluconsäurekonzentration 4 g/l ist der Peak von dem Ketoglutarsäure Peak getrennt und kann quantitativ ausgewertet werden (Abbildung 4.32, Gluconsäure ab 6,5 Tagen). Gluconsäure wird von vielen *Aspergilli*, z.B. *A. niger*, und *Penicillia* gebildet. Die Produktion beruht auf der enzymatischen Oxidation von Glucose durch eine von dem Pilz ins Medium ausgeschiedene Glucose-Oxidase (Schlegel, 1985). Über eine Glucose-Oxidase Aktivität bei *A. terreus* werden in der Literatur keine Hinweise gefunden. Eigene Versuche zeigen, dass bei einer Sauerstoffunterversorgung vermehrt Gluconsäure gebildet wird. Gründe hierfür sind bislang nicht bekannt. Bei den unbekannten Peaks (7,33 und 10,622 min) werden zunächst die Höhen der Peaks ausgewertet. Der unbekannte Peak 1 ist nach einem Tag Kultivierung nicht vorhanden. Nach 1,5 Tagen Kultivierungsdauer wird diese unbekannte Substanz produziert und nimmt während der weiteren Kultivierung ab. Der unbekannte Peak 2 nimmt während der IA-Produktionsphase zu.

Bei der Fermentation mit täglicher Phosphatzugabe (Abbildung 4.33) werden 3,5 g/l Ketoglutarsäure, 3 g/l Äpfelsäure und 0,02 g/l Fumarsäure produziert. Pyruvat und

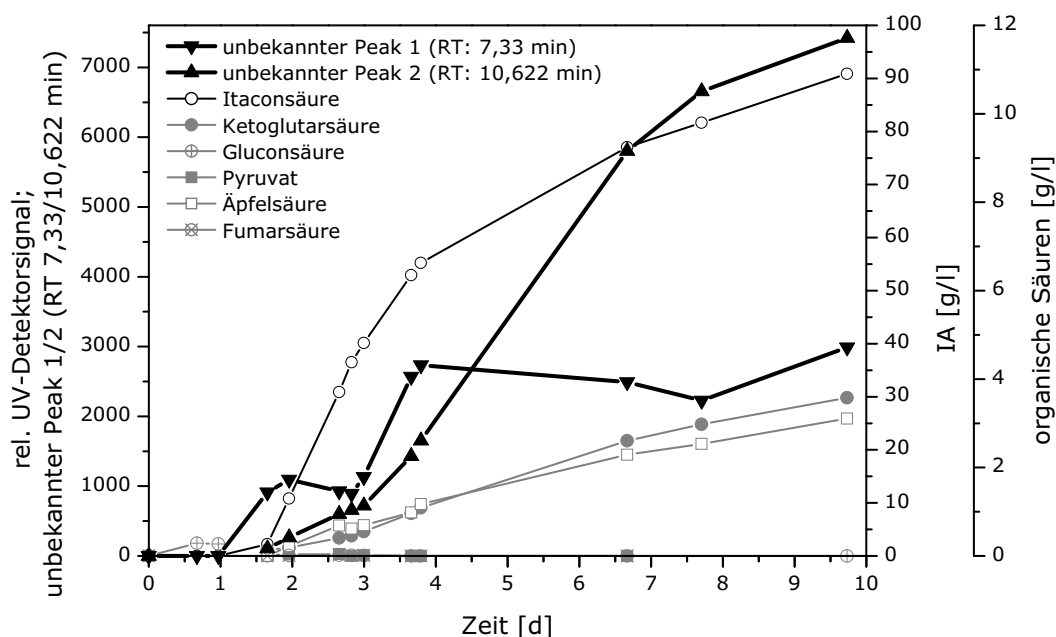


Abbildung 4.33: Zeitlicher Verlauf der Nebenprodukte (Verdünnung 1:100) von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter bei der Kultivierung mit täglicher Phosphatzugabe, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Gluconsäure können nicht quantitativ ausgewertet werden, da die Peaks nicht von dem Ketoglutarsäure Peak getrennt werden und somit vermutlich in geringen Konzentrationen (<4 g/l) vorliegen. Die Substanz des unbekannten Peaks 2 nimmt zwischen 1,5 und 3 Tagen gering und ab dem 3. Tag bis zum Ende der Fermentation stark zu.

Interessant ist der Verlauf der Substanz des unbekannten Peaks 1. Diese wird bei der Fermentation mit Sauerstoffunterbrechung nach 1,5 Tagen produziert und nimmt anschließend stetig ab. Bei dieser Fermentation (keine Sauerstoffunterbrechung und gute IA-Produktion) beginnt die Produktion dieser Substanz auch nach einem Tag und steigt bis zum zweiten Tag der Kultivierung an. Ab diesem Zeitpunkt befindet sich der Pilz in der maximalen Produktionsphase und die Höhe des unbekannten Peaks 1 sinkt. Zwischen drei und vier Tagen ist die IA-Produktion geringer, aber die Höhe des unbekannten Peaks 1 steigt. Nach vier Tagen Kultivierung nimmt die IA-Produktivität erneut ab und die Höhe der unbekannten Substanz sinkt und bleibt anschließend nahezu konstant. Die Konzentration dieser unbekannten Substanz (unbekannter Peak 1) verhält sich in den Phasen der unterschiedlichen IA-Produktion sehr verschieden. Der Verlauf ist bei einem Produktionsverlauf, der dem einer Referenz entspricht, charakteristisch. Daher liegt die Vermutung nah, dass es sich bei dieser Substanz um eine Substanz handelt, die direkt mit der IA-Produktion zusammenhängt.

Aus diesem Grund wird das Verhalten der IA-Vorstufe, cis-Aconitsäure, genauer untersucht. Cis- und trans-Aconitsäurestandards werden mittels HPLC qualitativ analysiert und mit diesen bekannten Konzentrationen quantifiziert (Abbildung 4.34).

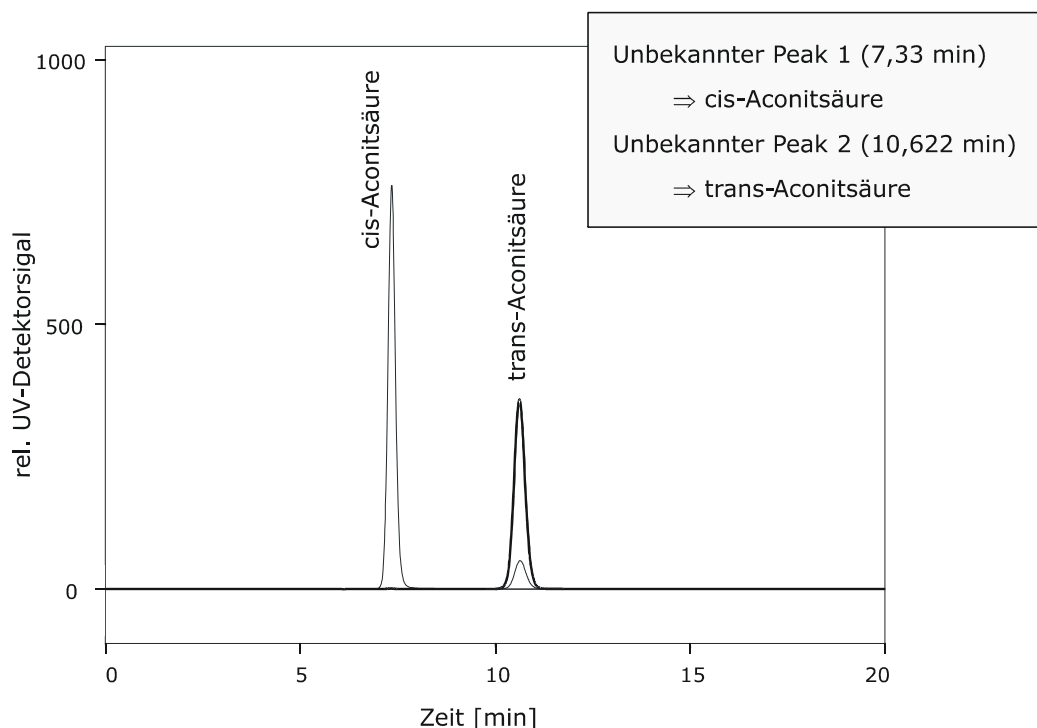


Abbildung 4.34: UV-Detektorsignal der cis- und trans-Aconitsäure; HPLC: Säule - BioRad HPX87H, Fluss 0,6 ml/min, T 23 °C, Laufmittel 5 mM H₂SO₄

Durch diese Retentionszeiten und zusätzlich durch Standardadditionen wird gezeigt, dass es sich bei dem unbekannten Peak 1 (RT: 7,33 min) um die Vorstufe der IA, cis-Aconitsäure, handelt. Der unbekannte Peak 2 (RT: 10,6 min) stellt die trans Form der Aconitsäure dar.

Mit dieser Kenntnis der Nebenprodukte und die Möglichkeit der qualitativen Bestimmung werden Versuche, bei denen sich die Produktbildung sowie das Redoxsignal von der Referenz unterscheiden, erneut ausgewertet (Abbildung 4.35). Der Verlauf der cis-Aconitsäure bei der Referenz und bei der Zugabe von 0,02 g/l Cystein entspricht dem Verlauf des unbekannten Peak 1 bei dem Versuch der täglichen Phosphatzugabe. Dies bedeutet, dass in der Phase der maximalen Produktivität die cis-Aconitsäure Konzentration konstant bleibt bzw. sogar sinkt. Die im Citratzyklus gebildete cis-Aconitsäure wird somit sofort weiter zu IA umgesetzt, deren Konzentration in dieser Phase am schnellsten zunimmt. Nach 3 Tagen steigt jedoch die cis-Aconitsäure Konzentration stark an. Dies deutet darauf hin, dass entweder mehr cis-Aconitsäure produziert wird, als durch die cis Aconitat-Decarboxylase zu IA umgesetzt werden kann, oder dass der Transport der cis Form durch die mitochondriale Membran der zeitlich begrenzende Faktor darstellt und sich somit ansammelt.

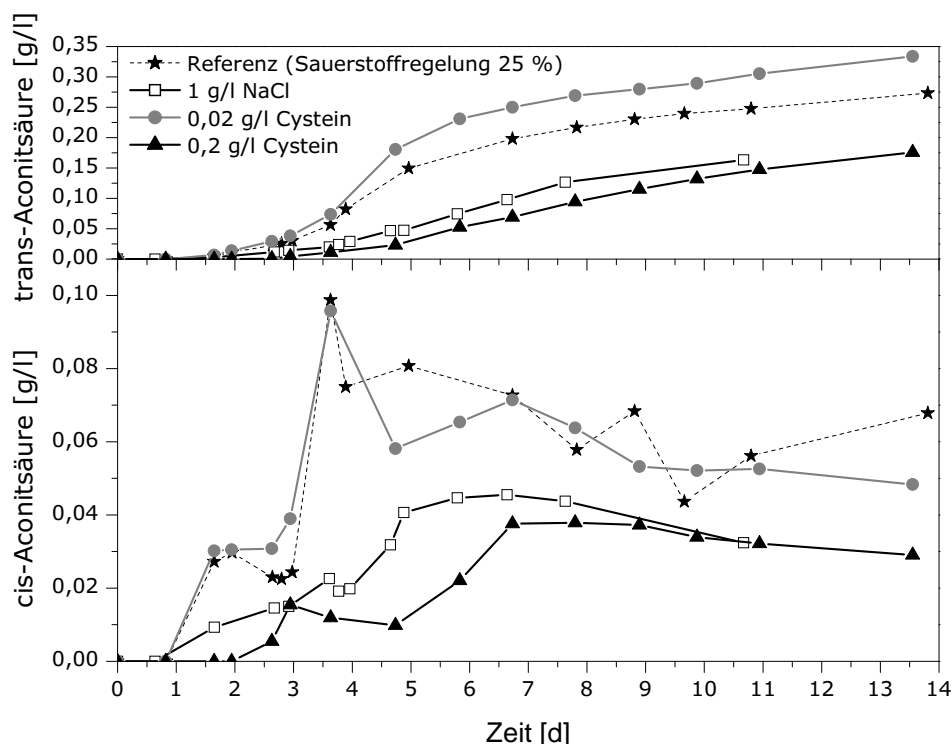


Abbildung 4.35: Cis- und trans-Aconitsäure bei verschiedenen Kultivierungen von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt

Genau zu diesem Zeitpunkt, nach 3 Tagen (Abbildung 4.33) steigt die Konzentration der trans-Aconitsäure. Trans-Aconitsäure ist im Unterschied zu den anderen beschriebenen Nebenprodukten kein direktes Zwischenprodukt des Stoffwechsels. Es handelt sich um das Isomer der cis-Aconitsäure und entsteht durch physikalische/chemische Umlagerung einer Carbonsäuregruppe. An die Phase des stärksten Verbrauchs von cis-Aconitsäure schließt sich ein deutlicher Anstieg der trans-Aconitsäure im Medium an.

Der Vergleich der Verläufe von Itaconsäure, cis- und trans-Aconitsäure lässt darauf schließen, dass ab dem Zeitpunkt sinkender IA-Produktion auch der Verbrauch von cis-Aconitsäure nachlässt. Diese wird dann vermutlich größtenteils in trans-Aconitsäure umgelagert, was mit dem kontinuierlichen Anstieg dieses Nebenprodukts erklärt werden kann. Eine genauer Untersuchung der cis/trans-Umwandlung erfolgt im nachfolgenden Abschnitt.

Bei der Zugabe von 0,2 g/l Cystein (Abbildung 4.29, Seite 83) und dem Zusatz von 1 g/l NaCl (Abbildung 4.22, Seite 77) konnte eine Abweichung von dem Standardproduktionsverlauf beobachtet werden. In beiden Fällen tritt nach 2,5 und 4 Tagen keine Erniedrigung der Produktivität auf. Bei diesen zwei Versuchen kann bei dem Verlauf der cis-Aconitsäure keine enorme Zunahme wie bei der Referenz beobachtet werden. Auch die Konzentration der trans Form ist bei diesen Ansätzen am geringsten und zeigt keine deutliche Steigerung nach drei Tagen.

Dies zeigt, dass durch die Zugabe von 0,2 g/l Cystein und 1 g/l NaCl noch unbe-

kannte Veränderungen in der Zelle bewirkt werden, die gerade bei dem Einsatz von 1 g/l NaCl dazu geführt haben, dass nach 2,5 Tagen eine Steigerung der Produktivität auftrat. Durch diese Versuche kann keine Steigerung der maximalen Produktivität oder der Endkonzentration erzielt werden, aber sie geben Hinweise darauf, dass die Produktivitätseinbußen vermutlich mit den Aktivitäten der Aconitase (Eisen bedürftig), der cis-Aconitat Decarboxylase und der transmembranen Transportvorgänge zusammenhängen.

• Stabilität der Aconitsäure

(cis-trans Umlagerung bei verschiedenen Temperaturen)

Die trans-Aconitsäure wird nicht im Stoffwechsel synthetisiert. Daher wird in diesem Abschnitt die cis/trans Umlagerung in Abhängigkeit von der Temperatur (20, 24, 33 und 40 °C) untersucht.

Wird ein frisch angesetzter cis-Aconitsäure Standard mittels HPLC vermessen, so liegen bereits 8 % der trans Form vor (Abbildung 4.36). Um so höher die vorliegende

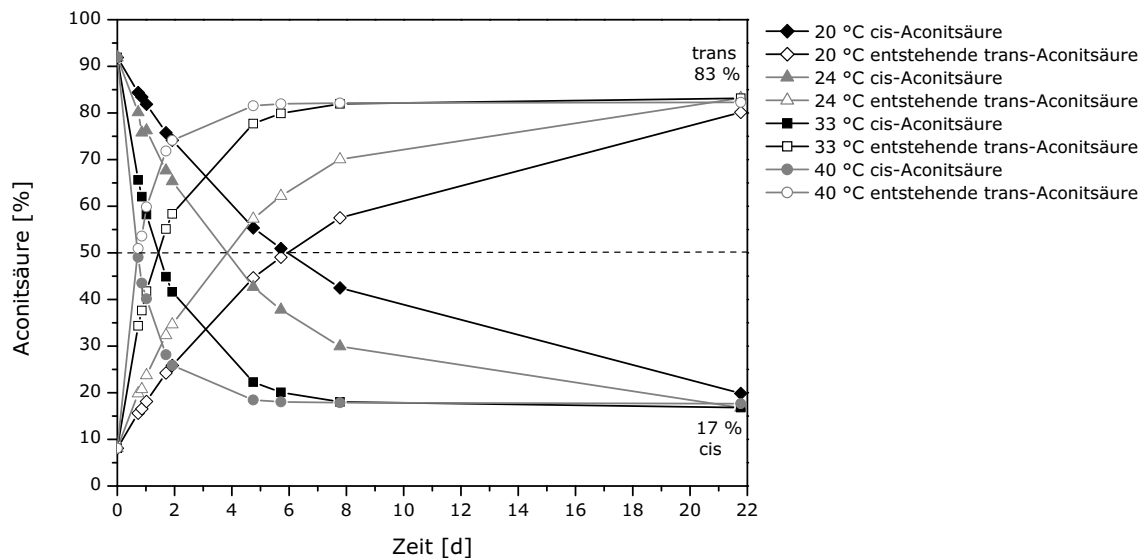


Abbildung 4.36: cis-Aconitsäure Standard, zeitlicher Verlauf der cis/trans Umlagerung bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur ist, desto schneller vollzieht sich die Umlagerung in die trans Form. Es stellt sich unabhängig von der Temperatur ein Verhältnis von 83 % trans : 17 % cis-Aconitsäure ein. Die Fermentationen werden bei 33 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur lagern sich nach 1,5 Tagen 50 % der cis in die trans Form um.

Wird bei der Fermentation die cis-Aconitsäure schneller synthetisiert, als sie durch die mitochondriale Membran transportiert und im Cytosol durch die Decarboxylase zur IA umgesetzt werden kann, lagert sich die cis-Aconitsäure in die trans-Aconitsäure um.

In einem weiteren Ansatz wird untersucht, wie sich die trans-Aconitsäure bei 33 °C verhält (Abbildung 4.37). Wird ein frisch angesetzter trans-Aconitsäure Standard vermessen, liegen lediglich 0,25 % in der cis Form vor. Nach ungefähr 4 Tagen hat

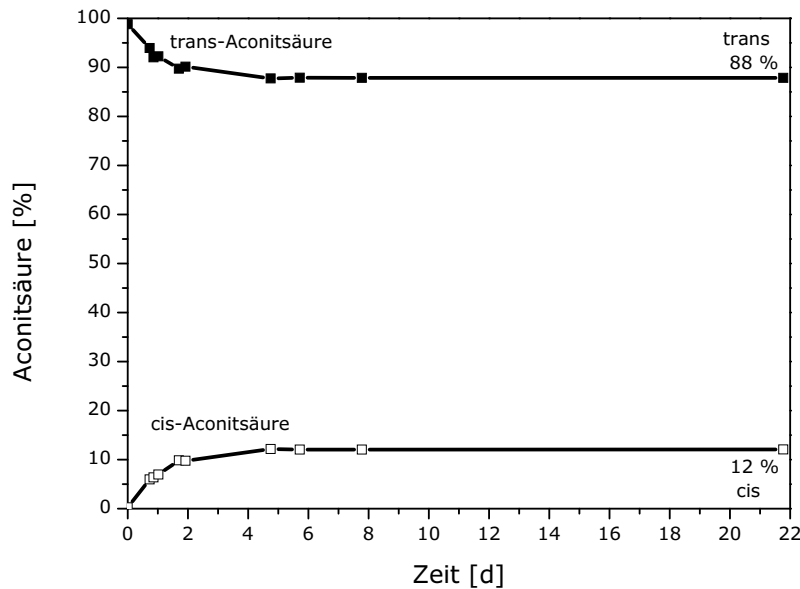


Abbildung 4.37: Trans-Aconitsäure Standard, zeitlicher Verlauf der trans/cis Umlagerung bei 33 °C

sich ein Gleichgewicht mit 88 % trans : 12 % cis-Aconitsäure eingestellt.

Sammelt sich die cis-Aconitsäure, die im Citratzyklus gebildet wird, in den Mitochondrien an, bildet sich ein Gleichgewicht zwischen der cis und trans Form, das deutlich auf der Seite der trans Form liegt. Dies hat zwei negative Folgen:

1. Die trans-Aconitsäure ist ein kompetitiver Hemmer der Aconitase (Glusker, 1971). Das Enzym Aconitase katalysiert im Citratzyklus die Gleichgewichtseinstellung zwischen Citronensäure, cis-Aconitsäure und Isocitronensäure. Die trans-Aconitsäure konkurriert um die Bindung an dem Enzym und blockiert somit dessen Aktivität. Diese Enzymaktivität fehlt um aus der Citronensäure cis-Aconitsäure herzustellen.
2. Durch die entstandene trans-Aconitsäure geht der IA Biosynthese Kohlenstoff verloren, da die cis Aconitat-Decarboxylase cis-Aconitsäure als Substrat verwendet, aber mit der trans-Aconitsäure keine Aktivität zeigt (Schomburg and Schomburg, 2002).

4.2.5.2 Produkthemmung

Im Verlauf einer Standardkultivierung (Abbildung 4.13, Seite 69), sinkt die Produktivität von *A. terreus* nach 4 Tagen und ungefähr 60 g/l IA. Die Ursache für diesen Effekt ist bisher nicht aufgeklärt. Eine Limitierung durch das Substrat kann ausgeschlossen werden, da zu diesem Zeitpunkt mit ca. 80 g/l noch ausreichend Glucose im Reaktor vorhanden ist. Ein möglicher Zusammenhang mit dem Pilzwachstum kann ebenfalls vernachlässigt werden, da die Bildung von Itaconsäure ein wachstumsentkoppelter Prozess ist (Welter, 2000). Die im Folgenden dargestellten Versuche sollen aufklären, ob es sich beim eingangs

umschriebenen Effekt um die hemmende Wirkung des Produkts handeln könnte.

• IA-Vorlage im Kultivierungsmedium

Infolge der IA Zugabe zu Beginn der Fermentation liegt der Start pH-Wert dieser Kultivierung bei 1,97 (Abbildung 4.38). Der Eintritt des Wachstums erfolgt deutlich verzögert. Erst nach ca. sechs Tagen kann eine Sporenkeimung und Myzelbildung beobachtet werden, was mit dem beginnenden Absinken des pO_2 -Gehaltes korreliert.

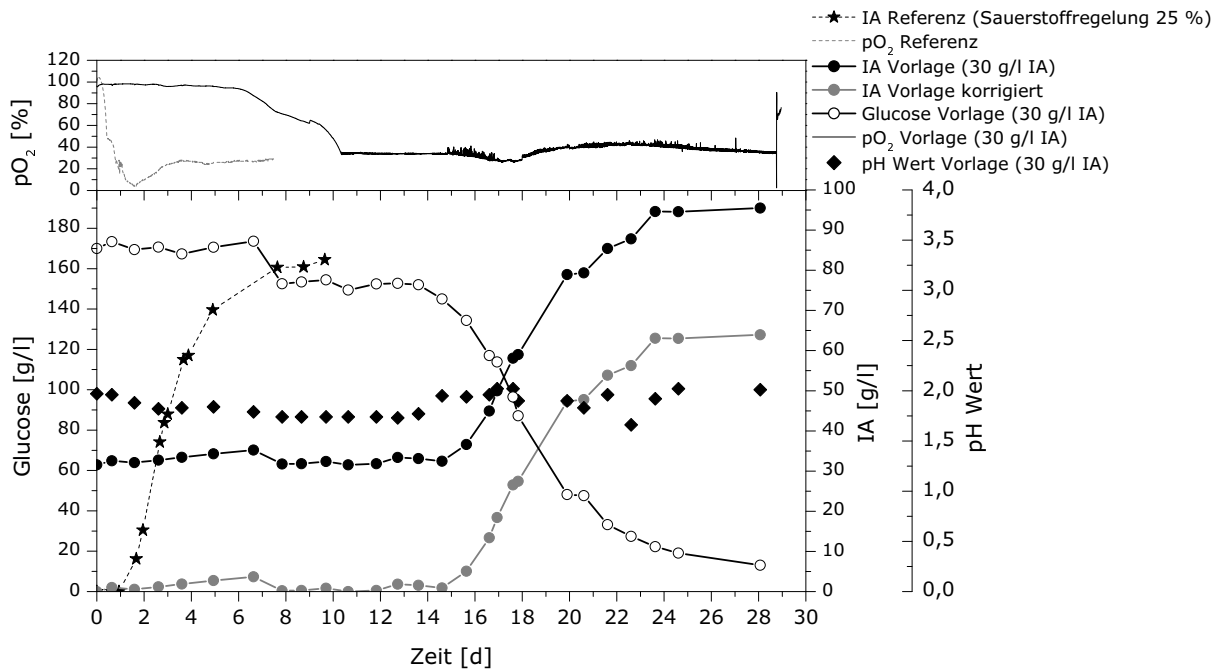


Abbildung 4.38: Kultivierungsverlauf von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter mit Vorlage von 30 g/l Itaconsäure, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Es ist nicht klar, ob dieses verzögerte Wachstum direkt mit dem Vorhandensein von Itaconsäure im Medium zusammenhängt oder ob der niedrige pH-Wert ausschlaggebend ist. Bei Versuchen von Welter mit Itaconsäurevorlage und dem Start pH 3,1 werden keine Angaben über die Auswirkung auf das Wachstum gemacht (Welter, 2000). Von Lockwood wurde festgestellt, dass nach 12 Tagen in Oberflächenkultivierungen mit pH-Werten unter 1,9 kaum Wachstum und Itaconsäurebildung auftreten, während in Kultivierungen mit pH-Werten über 2,3 das Biomassewachstum ausgeprägt war (Lockwood and Reeves, 1945). Bei Folgeversuchen mit unterschiedlichen Start pH (zwischen 1,2 und 3) in Submerskulturen berichtet er von stärkerer Myzelentwicklung bei steigendem pH-Wert, jedoch nicht von verzögertem Wachstum (Lockwood and Nelson, 1946).

Die Bildung der Itaconsäure beginnt nach ca. 15 Tagen. Bis zum Abbruch der Kultivierung nach 28 Tagen wurden zusätzlich zu den vorgelegten 30 g/l ungefähr 65 g/l IA produziert. Insgesamt beträgt die Gesamtkonzentration der IA im Reaktor 95 g/l und liegt ca. 8 g/l über der Endkonzentration der Referenzkultivierung. Nach dieser

langen Kultivierungsdauer trat aber eine zusätzliche Verdunstung von etwa 5 % auf. Unter Berücksichtigung dieser Verdunstung läge die Endkonzentration bei ungefähr 90 g/l, was der Endkonzentration der Referenz nahezu entspricht.

- **IA Zugabe verschiedener Konzentrationen während der stabilen Produktionsphase**

In zwei weiteren Versuchen wurde das Phänomen der Produkthemmung genauer untersucht. Dazu wurde während der Phase maximaler Produktivität die Itaconsäurekonzentration im Reaktor durch eine manuelle IA-Zugabe erhöht (Abbildung 4.39).

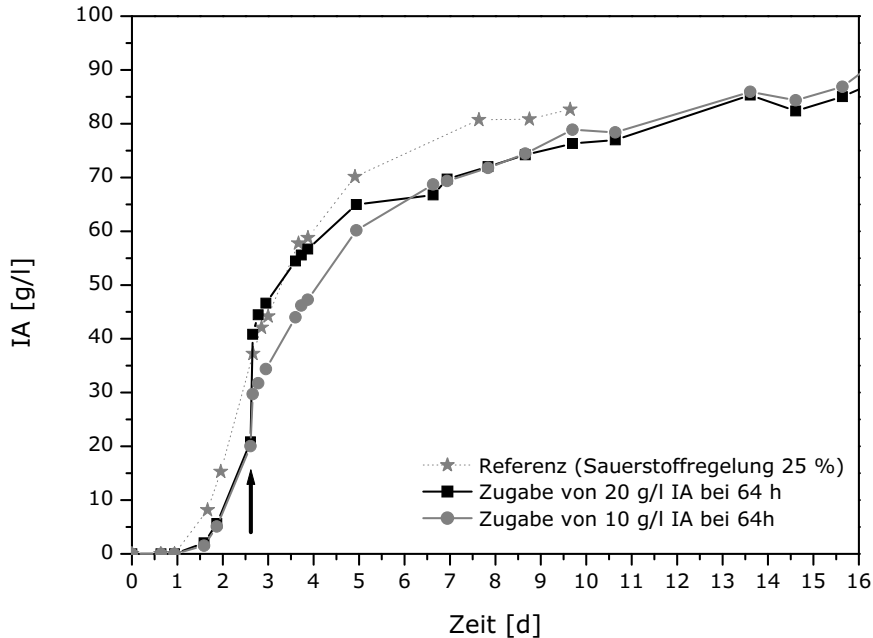


Abbildung 4.39: Kultivierungsverlauf von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter mit Zugabe von 10 bzw. 20 g/l Itaconsäure nach 64 Stunden, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

Die Kultivierung verläuft zu Beginn vergleichend mit der Referenz und beginnt nach ca. 24 Stunden mit der Itaconsäureproduktion. Nach 64 Stunden Kultivierungsdauer wird die Konzentration der Itaconsäure im Reaktor durch die Zugabe von 50 ml einer IA-Stammlösung mit 200 g/l, bzw. 400 g/l erhöht. Direkt nach der Zugabe sinkt die Produktbildungsrate auf 0,6 g/(lh) ab und bleibt in diesem Bereich bis zum fünften Tag der Kultivierung. Zu diesem Zeitpunkt werden 60 g/l, bzw. 65 g/l Itaconsäure im Reaktor erreicht, eine deutliche Abnahme der Produktivität ist sichtbar. Nach 16 Tagen beträgt die Endkonzentration im Reaktor 86,9 g/l, bzw. 85 g/l IA.

Die Biomasseentwicklung der Fermentationen mit Itaconsäurezugabe waren analog zur Referenzkultivierung. Zum Zeitpunkt der Zugabe war in beiden Fällen die stationäre Wachstumsphase mit durchschnittlich 6 bis 7 g/l BTM erreicht.

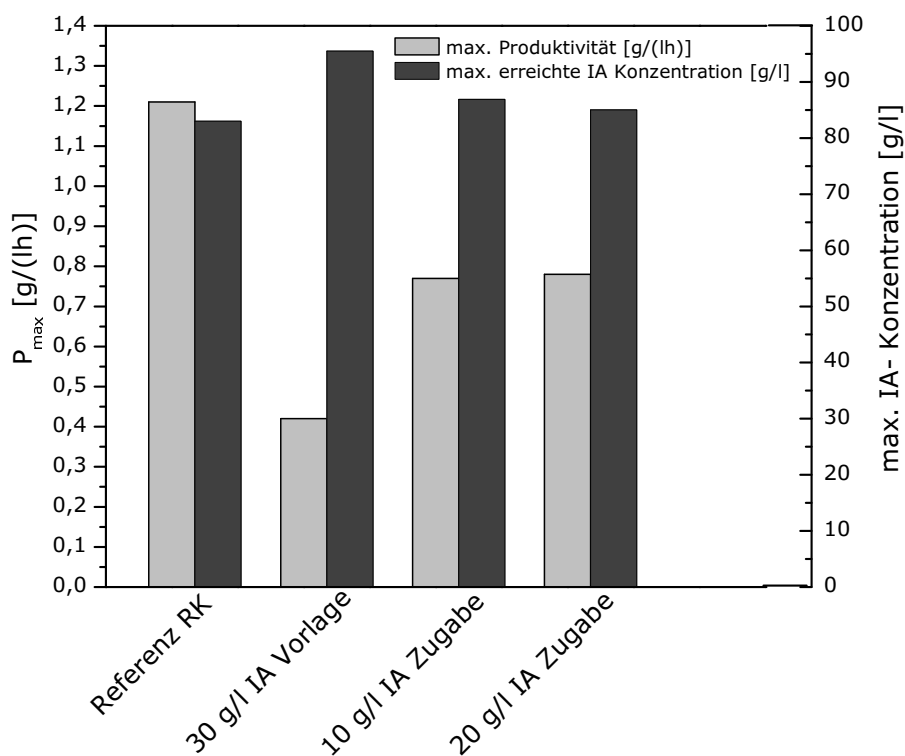


Abbildung 4.40: Übersicht der maximalen Produktivitäten und IA-Endkonzentrationen von *Aspergillus terreus* LU02b mit Vorlage von 30 g/l IA, mit Zugabe von IA in unterschiedlichen Konzentrationen nach 64 h und des Medien austauschs im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

• Diskussion der Produkthemmung

In der Kultivierung mit Itaconsäurevorlage setzten sowohl Wachstum als auch Itaconsäureproduktion mit Verspätung ein. Die maximale Produktivität ist deutlich geringer, als die der Referenz (Abbildung 4.40). Die Endkonzentration der Itaconsäure im Reaktor liegt bei 95 g/l inklusiv der vorgelegten 30 g/l, ist aber vermutlich aufgrund von Verdunstungseffekten durch die überdurchschnittlich lange Kultivierungsdauer effektiv geringer. Es wurden 65 g/l IA hinzuproduziert.

In den beiden Reaktoren mit Itaconsäurezugabe sind vergleichbare Antworten auf die Zugabe, unabhängig von der extern zugesetzten Menge, zu beobachten:

- Die Produktivität sinkt unmittelbar nach der Zugabe.
- Sind zwischen 60 und 65 g/l IA-Konzentration im Reaktor erreicht, knickt die Produktivität, unabhängig von externer Zugabe oder eigens gebildeter Itaconsäure, ein.
- Die Endkonzentrationen liegen vergleichbar bei ca. 86 g/l.

Die direkte Abnahme der Produktivitäten nach der Konzentrationserhöhung der Itaconsäure während der Phase maximaler Produktivität spricht dafür, dass eine

gewisse Konzentrationsschwelle erreicht wird, ab der eine hemmende Wirkung der Itaconsäure eintritt. Dieser Effekt scheint sich mit zunehmender IA-Menge zu verstärken, so dass bei Werten von 60 bis 65 g/l IA ein deutliches Einknicken im Kurvenverlauf zu erkennen ist. Trotz externer Zugabe von Itaconsäure wird die Höhe der Endkonzentration im Vergleich zu einer Referenzkultivierung nicht verändert.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, mit Vorlage und Zudosage von Itaconsäure, deuten auf eine Produkthemmung hin. Es ist aber nicht auszuschließen, dass dies eine Reaktion auf sich verschlechternde Bedingungen im Stoffwechsel der IA-Herstellung darstellen. Die Untersuchungen der Nebenprodukte zeigen, dass sich bei einer Standardfermentation cis-Aconitsäure genau zu dem Zeitpunkt ansammelt, zu dem auch die Produktivität sinkt. Zum einem würde sich bei einer Produkthemmung zu diesem Zeitpunkt die Vorstufe, cis-Aconitsäure, ansammeln. Zum anderen würde aber auch die Produktivität sinken, wenn z.B. die Aktivität der cis Aconitat-Decarboxylase sinkt. Weiterhin könnte sich ein noch nicht bekannter Stoff während der Fermentation in der Fermentationsbrühe ansammeln, welcher inhibierend auf die weitere IA-Produktion wirkt.

4.3 Kultivierung in verschiedenen Reaktorformen

Für die fermentative Itaconsäureherstellung mittels *Aspergillus terreus* wurden in der Literatur unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt. Betrachtet wurden Kultivierungen im Batch-, Fed-Batch und kontinuierlichen Betrieb mit freien und immobilisierten Pilzmyzel (Kobayashi et al., 1972; Kautola et al., 1989; Park et al., 1993; Welter, 2000).

In dieser Arbeit werden zunächst die beiden Reaktortypen Rührreaktor und Umwurfreaktor miteinander verglichen, die sich im Wesentlichen durch ihre Strömungsführung unterscheiden. Weiterhin wird eine Maßstabsvergrößerung um den Faktor 10 (10 l) im Rührreaktor durchgeführt.

4.3.1 Kultivierung von *Aspergillus terreus* in der 1,5 l Multi-fermentieranlage

Der Rührreaktor (Kapitel 3.1.4, Seite 31) mit 1,5 l Volumen ist das Standardsystem, das für Versuchsfermentationen des Forschungsprojektes „Herstellung von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen“ eingesetzt wird.

Dargestellt wird eine Standardfermentation des Pilzes *A. terreus* LU02b unter optimalen Bedingungen, die ebenfalls als Vergleich zu den Stammsammlungstämmen NRRL 1960 und 1963 dient (Abbildung 4.48, Seite 107). Bei störungsfreiem Betrieb der Fermentation ergibt sich der in Abbildung 4.41 dargestellte Kultivierungsverlauf. Vor dem Animpfen wird nach ausgiebiger Begasung die Belüftung eingestellt. Mit dem Auskeimen der Sporen und dem beginnenden Wachstum der Biomasse sinkt der Sauerstoffgehalt im Reaktor. Durch die Sauerstoffregelung wird die Luftzufuhr geöffnet und soweit möglich auf 25 % gehalten. Nach ca. 48 Stunden geht die exponentielle Wachstumsphase des Pilzes in die

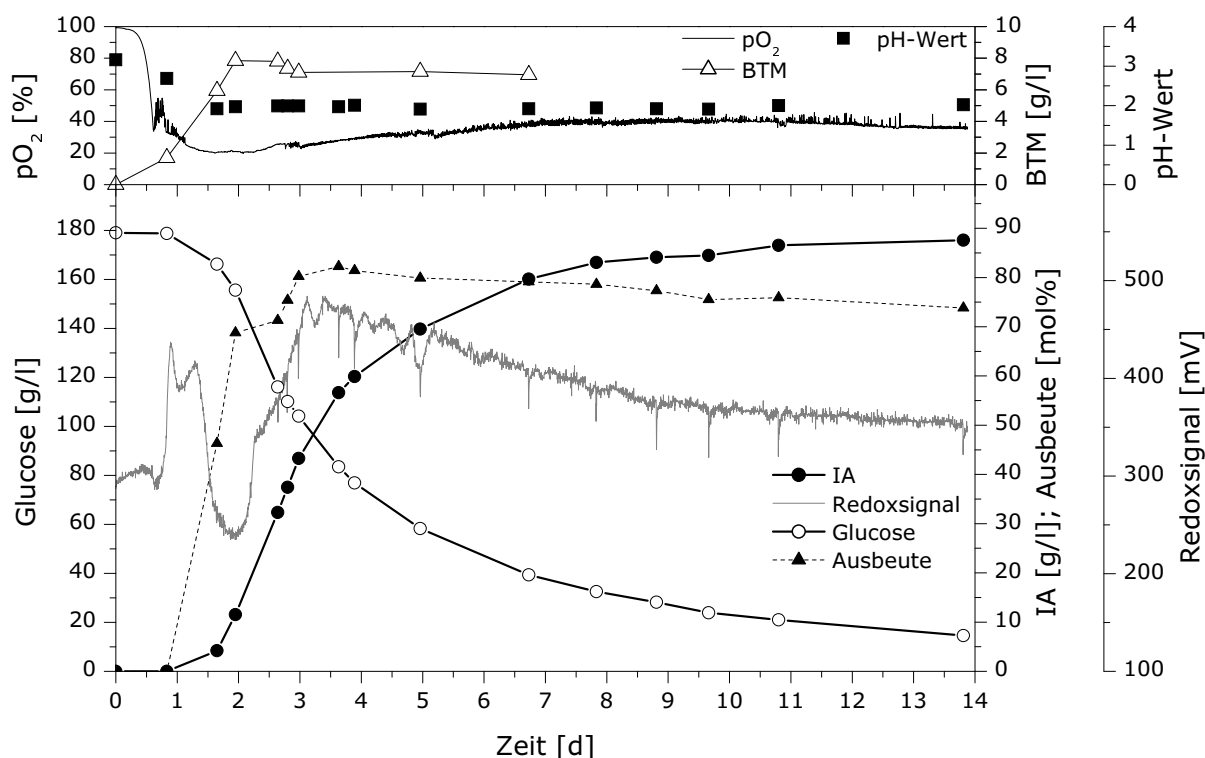


Abbildung 4.41: Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungerregelt

stationäre Phase mit ca. 7 g/l BTM über. Während der Wachstumsphase sinkt der pH-Wert der Kultivierung von 3,1 auf pH 1,9 und bleibt bis zum Fermentationsende nahezu konstant auf diesem niedrigen Niveau. Der Pilz wächst in Form von lockeren, kleinen Pellets, mit einem Durchmesser von ungefähr 0,1 mm. Der Rand dieser Pilzagglomeration ist lose und ausgefranst mit einzelnen langen Myzelfäden (vergleichbar mit der Abbildung 4.21, Seite 76, mit 5 g/l CaCl₂).

Nach ca. 20 Stunden beginnt der Pilz, bei gleichzeitiger Glucoseabnahme, mit der IA-Produktion. Zwischen 2 und 3 Tagen besitzt die IA-Produktionskurve die größte Steigung. Ab dem vierten Tag flacht der Kurvenverlauf ab, es wird immer weniger Itaconsäure neu gebildet. Nach acht Tagen Kultivierungsdauer ist eine Itaconsäurekonzentration von 83,1 g/l im Reaktor erreicht, zu diesem Zeitpunkt sind noch weitere 32,6 g/l Glucose vorhanden. Die Verlängerung der Kultivierung um weitere sechs Tage führt zu einem geringen Anstieg der IA auf 87,6 g/l, während 18 g/l Glucose verbraucht werden.

In einem deutschen Patent konnten mit dem Stamm *A. terreus* NRRL 1960 nach sieben Tagen ca. 90 g/l IA erzeugt werden (Batti and Schweiger, 1963). Kultivierungen des Stammes *A. terreus* NRRL 1963 mit ähnlichem, angepasstem Medium im Schüttelkolben erbrachten lediglich 50 g/l nach acht Tagen Fermentationsdauer (Welter, 2000). In einer Fedbatch-Kultivierung von *A. terreus* LU02b wurden nach acht Tagen ca. 40 g/l und nach 25 Tagen 80 g/l Itaconsäure erreicht (Jahnz et al., 2003).

Die Kultivierung startet mit einem Redoxpotenzial von ca. 300 mV. Zeitgleich mit dem Begasungsstart werden 0,3 ml Antischaummittel zugegeben, infolge dessen steigt das Re-

doxpotenzial auf 450 mV. Bis zum Beginn der stärksten Produktionsphase ist es auf ein Minimum von 250 mV gesunken steigt im weiteren Verlauf stufenweise auf knapp 500 mV. Bis zum Kultivierungsende sinkt das Redoxpotenzial langsam aber kontinuierlich auf einen Endwert von 350 mV ab. Die Produktivität ist im Zeitraum von 2 und 3 Tagen mit 1,29 g/(lh) maximal. Nach einem Kultivierungszeitraum von knapp drei Tagen nimmt die Produktivität ab. Zeitgleich ist ein Knick im Kurvenverlauf des Redoxpotenzial zu beobachten.

Nach zwei Tagen wird eine Ausbeute von fast 70 mol% und nach vier Tagen 82 mol% erreicht. Bis zum Kultivierungsende sinkt sie langsam auf 73 mol% ab. Ausbeuten über 80 mol% können erreicht werden, da die Bildung der IA nicht an das Wachstum der Biomasse gebunden ist. Der Großteil des Substrates wird in das Produkt umgesetzt. Ein geringerer Anteil dient vermutlich der Biomassebildung, der Bereitstellung von Energie sowie dem Erhaltungsstoffwechsel, durch den Kohlenstoff in Form von CO₂ freigesetzt wird. Weiterhin werden aus ca. 3 % der verbrauchten Glucose Nebenprodukte gebildet (Abbildung 4.42). Nach zwei Tagen und im weiteren Verlauf ist Gluconsäure bedingt durch

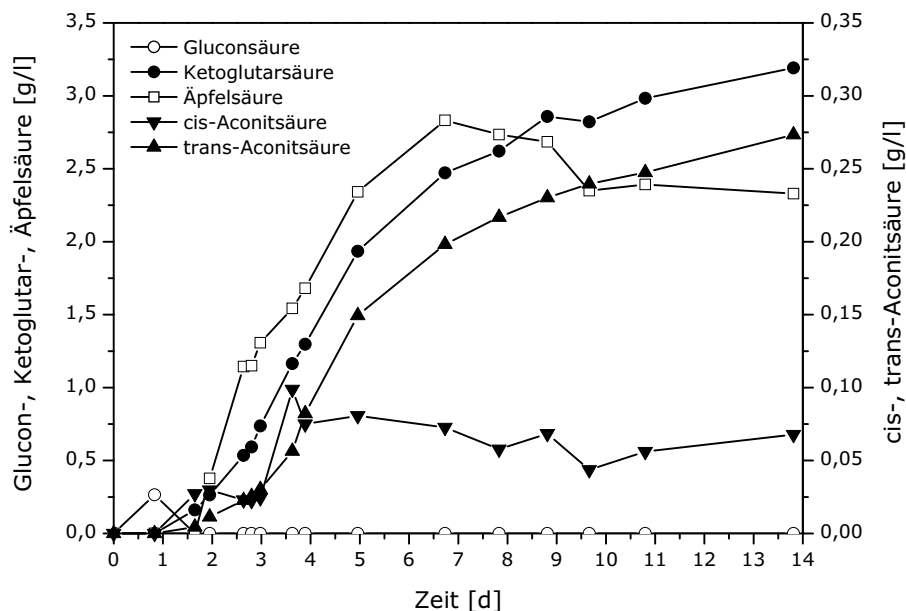


Abbildung 4.42: Nebenprodukte der Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

die HPLC-Analytik nicht mehr nachweisbar, da Konzentrationen kleiner als ca. 4 g/l vom Peak der Ketoglutar- verdeckt werden und somit quantitativ nicht auswertbar sind. Bei den Nebenprodukten Ketoglutar-, Äpfelsäure und cis-Aconitsäure handelt es sich um Zwischenprodukte des Citronensäurezyklus (Abbildung 2.3, Seite 8). Während des Kultivierungsverlaufes akkumulieren wenige Gramm Ketoglutar- und Äpfelsäure.

Nach sechs bis sieben Tagen wird Äpfelsäure nicht weiter angereichert, die Konzentration nimmt sogar wieder leicht ab. Dies deutet darauf hin, dass der Pilz die Äpfelsäure im Medium wieder in den Stoffwechsel zurückführt. Dies entspricht Ergebnissen von Eimhjellen, demnach kann *A. terreus* eine Vielzahl metabolischer Zwischenprodukte als Substrate nutzen (Eimhjellen and Larsen, 1955).

Bis zum Einsetzen der stärksten Produktbildungsphase werden zwischen 30 und 40 mg/l cis-Aconitsäure freigesetzt. Zwischen dem zweiten und dem dritten Tag sinkt die Konzentration wieder leicht ab, was darauf hindeutet, dass die cis Aconitat-Decarboxylase besonders aktiv ist. Die produzierte cis-Aconitsäure wird vollständig weiter umgesetzt. Nach ca. drei Tagen ist die maximale Produktivität überschritten, es reichern sich bis zu 100 mg/l im Medium an. Nach vier Tagen, zeitgleich mit der Abnahme der Itaconsäure-Produktionsrate, wird keine cis-Aconitsäure mehr ins Medium freigesetzt. Die Konzentration beträgt 75 mg/l und scheint sich bis zum Ende der Kultivierung noch leicht zu reduzieren. An die Phase des stärksten Verbrauchs von cis-Aconitsäure schließt sich ein deutlicher Anstieg der trans-Aconitsäure im Medium an.

In dieser Fermentieranlage wurde eine stabile, reproduzierbare fermentative IA-Herstellung mit dem Pilz *A. terreus* LU02b erreicht und die Ergebnisse dienen als Referenz für die Kultivierung im Umwurfreaktor und für den 10 l Rührkessel.

4.3.2 Kultivierung von *Aspergillus terreus* in dem 3 l Umwurfreaktor

Bei der Fermentation mit *A. terreus* im 1,5 l Rührreaktor kommt es zu starker Schaumbildung (Kapitel 4.2.1, Seite 67). Um dies zu verhindern wird der Einsatz eines Umwurffermentersystems zur IA-Herstellung getestet. Dies hat den Vorteil, dass durch die besondere Strömungsführung (Abbildung 2.4, Seite 16) der Schaum zerstört wird und sich keine geschlossene Schaumdecke ausbildet.

Die Sporenkeimung sowie das Wachstum des Pilzmyzels verliefen im Umwurfreaktor zeitlich vergleichend zum Rührreaktor. Abweichend vom Rührreaktor startet der Pilz mit der IA-Produktion, mit vergleichbarer Produktivität, aber erst nach drei Tagen. Nach fünf Tagen Kultivierungsdauer und einer IA Konzentration von ca. 50 g/l sinkt die Produktivität deutlich. Nach knapp 11 Tagen wird eine Endkonzentration von 75,9 g/l IA erzielt. Am Verlauf des Gelöstsauerstoffpartialdruckes ist deutlich zu erkennen, dass die Regelung der Belüftung nicht trivial ist. Nach ca. 24 Stunden fällt der pO_2 -Wert im Umwurfreaktor infolge des Sauerstoffverbrauchs durch das Biomassewachstums auf ca. 20 %. Zu diesem Zeitpunkt wird mit der manuellen Belüftung begonnen. Bis zum Beginn der Itaconsäureproduktion kann die Sauerstoffkonzentration relativ konstant gehalten werden. Mit einsetzender Produktion steigt der Verbrauch deutlich an, die Belüftungsrate wird angepasst. Diese beträgt bei maximaler Belüftung 0,03 v/vm. Im Bereich zwischen fünf und sieben Tagen ist die Phase maximaler Produktivität überschritten und der pO_2 -Gehalt steigt. Während des siebten Kultivierungstages kam es infolge eines Stromausfalls zu einer einminütigen Unterbrechung der Belüftung, was sich auf die IA-Produktion auswirkt. Dies zeigt erneut, wie empfindlich der Pilz auf eine kurzzeitige Unterbrechung der Sauerstoffversorgung reagiert.

Das Wachstum des Pilzes beginnt wie im Rührreaktor nach ca. 18 Stunden. Die Myzelbildung der ausgekeimten Sporen kann beobachtet werden. Die BTM beträgt nach drei Tagen durchschnittlich 10,5 g/l und liegt damit ca. 3 g/l höher als im Rührreaktor. Da auch im Umwurfreaktor die Fermentation mit Phosphatlimitierung durchgeführt wurde

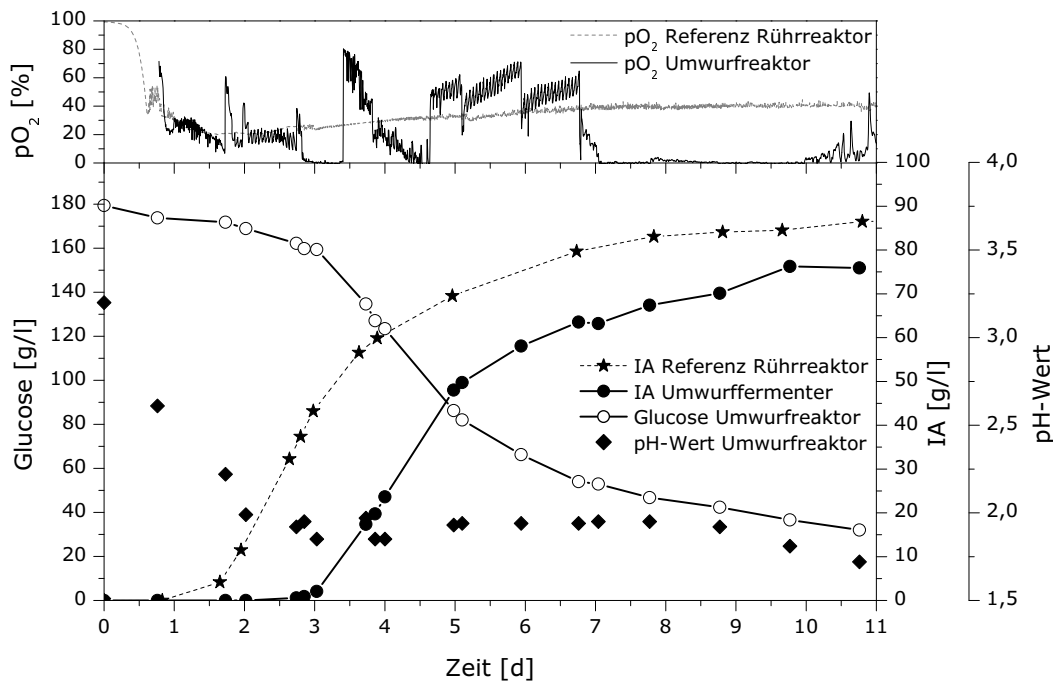


Abbildung 4.43: Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 3 l Umwurfreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

kann diese Erhöhung mit der Morphologie des Pilzes zusammenhängen. Im gerührten System liegen kleine, ausgefrante Pellets vor. Im Umwurfreaktor wächst der Pilz als lockeres, netzartig ausgebildetes Myzel (Abbildung 4.44). Bei der Zentrifugation bildet sich ein kompaktes Biomassepellet, das möglicherweise infolge der Wachstumsform bei den einzelnen Waschschritten schlecht rückgelöst werden kann. Es ist daher nicht auszuschließen, dass Salze durch das Myzel zurückgehalten werden, was den erhöhten Biomassegehalt erklärt.

Bei der Kultivierung im Umwurfreaktor wurden die Vorteile dieses Systems (Tabelle 2.4, Seite 17) beobachtet. Im störungsfreien Betrieb wird infolge der Strömungsführung keine Schaumdecke ausgebildet, auch ein nennenswerter Bewuchs der Einbauten ist trotz der freien Wachstumsform nicht zu erkennen. Das Überfallen der Kulturflüssigkeit in das Leitrohr scheint sich unterstützend auf den Eintrag des Sauerstoffs auszuwirken, da bereits sehr niedrige Belüftungsraten von unter 0,03 v/vm für die Begasung der Kultivierung ausreicht. Den pO₂-Gehalt mittels einer manuellen Belüftung konstant zu halten ist nicht trivial. Das System reagiert sehr empfindlich auf Änderungen in der Luftzufuhr. Der Pilz *A. terreus* benötigt für eine effiziente Produktbildung eine geringe aber konstante Sauerstoffversorgung. Es ist wahrscheinlich, dass die starken unkontrollierten Schwankungen in der hier durchgeführten Kultivierung die Itaconsäureproduktion negativ beeinflussen, was bei der Kultivierung mit dem oszillierenden Gelöstsauerstoffpartialdruck im Medium ebenfalls gezeigt wurde (Kapitel 4.2.1.2, Seite 70). Aus diesem Grund ist ein gut eingestelltes automatisches Reglersystem beim Betrieb dieses Reaktors empfehlenswert. Nachteilig für den Einsatz dieses Reaktorsystems ist die starke Abhängigkeit des Strömungsprofils von der Viskosität des Mediums. Zu Beginn der Kultivierung wurde die

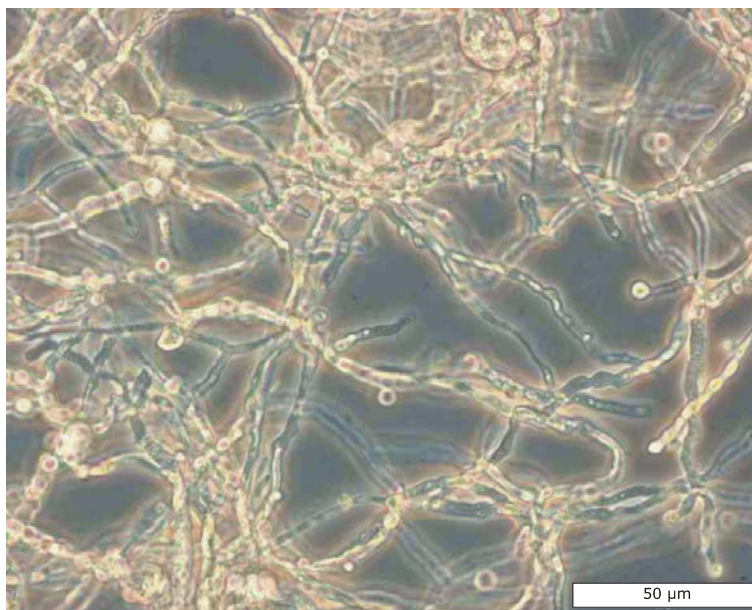


Abbildung 4.44: Mikroskopie der Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 3 l Umwurfreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt; 40fach vergrößert

Drehzahl von 700 Upm eingestellt, so dass auch mit steigender Viskosität ein genügend ausgeprägter Umwurf der Flüssigkeit gewährleistet ist. Aufgrund des Wachstums in Form von verzweigten Myzel erhöhte sich die Medienviskosität derart, dass die Drehzahl des Propellerrührers auf 730 Upm gesteigert werden musste, um weiterhin das Strömungsprofil aufrechtzuerhalten.

Es konnte nicht geklärt werden, warum die IA-Produktion einen Tag später einsetzte obwohl der Wachstumsverlauf dem im Rührreaktor entsprach. Weiterhin ist unklar, warum die IA-Endkonzentration 10 g/l niedriger ist als im Rührreaktor. Die Kultivierung von *A. terreus* LU02b im Umwurfreaktor benötigt aufgrund seiner Strömungsführung eine geringere Begasungsrate, aber es erfordert eine zusätzliche Kontrolle um trotz sich erhöhender Medienviskosität einen ausreichenden Umwurf durch Drehzahlerhöhung zu gewährleisten. Im Vergleich zum Rührreaktor verlief die IA-Produktion im Umwurfreaktor schlechter, die Ausbeute betrug nur ca. 74 mol%. Es ist fraglich ob durch eine Fermentationsoptimierung im Umwurfreaktor eine wesentliche Verbesserung der Produktivität des Pilzes erzielt werden kann.

4.3.3 Kultivierung von *Aspergillus terreus* in dem 15 l Rührreaktor

Für eine Umsetzung des Prozesses in den industriellen Maßstab ist es für eine Maßstabsvergrößerung von Vorteil, wenn bereits im Labor mit einem Rührkesselreaktor normierter Bauart gearbeitet wird. In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der Kultivierung im Rührkesselreaktor (Braun-Diessel, Melsungen) mit einem Gesamtvolumen von 15 l dargestellt. Kultiviert wurde mit insgesamt 10 l Medium unter vergleichbaren Bedingungen wie im

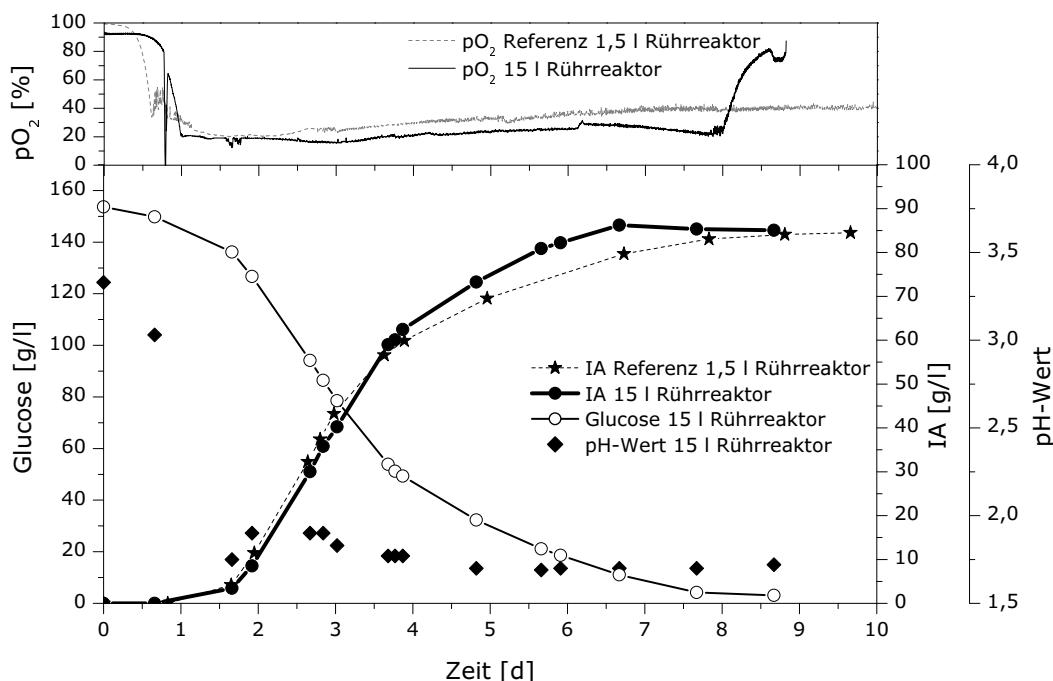


Abbildung 4.45: Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 15 l Rührreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 unregelt; 40fach vergrößert

1,5 l Rührreaktor.

Der Verlauf der Itaconsäurebildung ist im 15 l Rührkesselreaktor vergleichbar mit der Referenzkultivierung im 1,5 l Rührreaktor (Abbildung 4.45). Nach 16 Stunden Kultivierungsdauer beginnt der Pilz mit der IA-Produktion. Die Produktivität zwischen dem zweiten und vierten Kultivierungstag stimmt mit der im 1,5 l Rührreaktor überein. Nach vier Tagen und einer bis dahin erreichten Konzentration von ca. 60 g/l IA sinkt die Produktivität deutlich ab. Innerhalb von sieben Tagen werden 86,2 g/l Itaconsäure gebildet. Zu diesem Zeitpunkt wird eine Ausbeute von 86 mol% erzielt, während im 1,5 l Rührreaktor die Ausbeute 80 mol% beträgt.

Die Entwicklung der Pilzbiomasse im 15 l Rührkesselreaktor ist ähnlich der im 1,5 l Rührreaktor, nach 2 Tagen ist in beiden Reaktoren stationäres Wachstum bei 7 bis 8 g/l BTM erreicht. Die Morphologie des Pilzes unterscheidet sich von der im 1,5 l Rührreaktor durch das Wachstum in Form von losen, lockeren Myzel (Abbildung 4.45), wobei die Hyphen relativ kurz und schwächer verwoben sind. Da sich diese Kultivierungen nicht im Medium, der Temperatur, dem pH- oder pO₂-Verläufen unterscheiden muss die leichte Änderung der Morphologie auf die Unterschiede in dem veränderten Strömungsprofil bzw. dem Energieeintrag rückzuführen zu sein.

Die Übertragung der Kultivierung von speziell angefertigten 1,5 l Rührreaktoren kann in den 15 l Rührkesselreaktor normgerechter Bauart ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden.

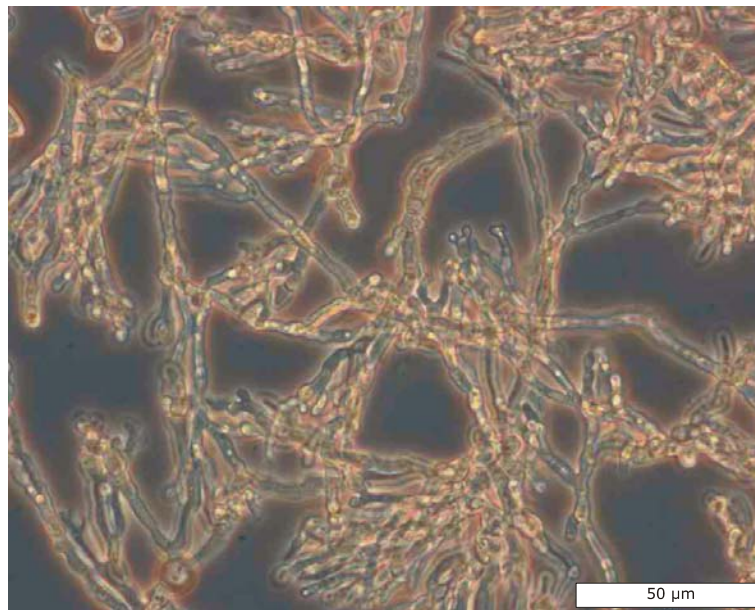


Abbildung 4.46: Mikroskopie der Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 15 l Rührreaktor, 33 °C, Start pH 3,1 unregelt; 40fach vergrößert

4.3.4 Vergleich: Itaconsäureherstellung mit *Aspergillus terreus* - Citronensäureherstellung mit *Aspergillus niger*

Die fermentative Citronensäureherstellung ist im Bezug auf den Mikroorganismus (*Aspergillus niger*) sowie der Biosynthese (Ausschleußung der Citronensäure aus dem Citratzyklus) der biotechnischen Itaconsäureherstellung sehr ähnlich. Seit 1891/93 ist die fermentative Citronensäureherstellung Gegenstand der Forschung. Die biotechnische Citronensäureherstellung ist zur Zeit eine der industriellen Hauptfermentationsprozesse (Roehr, 1998). Durch die jahrelange Forschung ist über diesen Fermentationsprozess viel bekannt und es können mit 8-10 g/l Biotrockenmasse nach 12,5 Tagen 200 g/l Citronensäure hergestellt werden (Roehr et al., 1996).

Im Vergleich zur Itaconsäureherstellung mit *Aspergillus terreus* LU02b im 15 l Rührreaktor (Abbildung 4.47) wird eine deutlich höhere Endkonzentration (200 g/l Citronensäure - 90 g/l Itaconsäure) erreicht. Allerdings ist die lag-Phase sowie die Produktivität bis 3,5 Tage Kultivierungsdauer beider Kultivierungen vergleichbar. Bei der Itaconsäureherstellung muss somit aufgeklärt werden, weshalb keine höheren Endkonzentrationen erreichbar sind, bzw. müssen leistungsfähigere Stämme gefunden und durch Mutation/Adaptation verändert werden, so dass auch bei der Itaconsäureherstellung höhere Endkonzentrationen erreicht werden können.

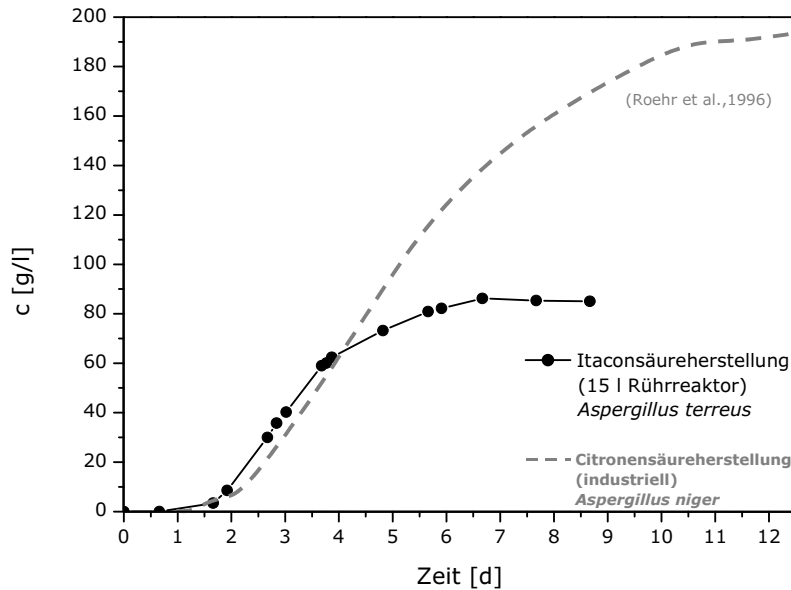


Abbildung 4.47: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von *Aspergillus terreus* LU02b, NRRL 1960, NRRL 1963 unter Standardbedingungen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt

4.4 Vergleich der IA produzierenden Stämme *Aspergillus terreus* NRRL 1960, 1963 und LU02b in 1,5 l Rührreaktoren

Die Stammsammlungsstämme *A. terreus* NRRL 1960 und 1963 werden unter den optimierten Standardbedingungen mit dem Eigenisolat LU02b im 1,5 l Rührreaktor unter vergleichbaren Bedingungen kultiviert (Abbildung 4.48). Die Stammsammlungsstämme schließen wie das Eigenisolat die Wachstumsphase nach ungefähr 2 Tagen ab und erreichen ca. 8 g/l BTM. Nach ungefähr 1,5 Tagen setzt die IA-Produktion ein. Das Eigenisolat hat zu Beginn der Produktionsphase bis 3 Tagen Kultivierung eine etwas höhere Produktivität als die Stammsammlungsstämme. Nach 3 Tagen sinkt die Produktivität des Stammes LU02b aber, was bei dem 1960er und 63er Stamm nicht eintritt. Nach 4 Tagen sinkt unabhängig vom Stamm die Produktivität. Der 1963 Stamm zeigt nach diesem Knick die höchste Produktivität, so dass dieser Stamm nach 10 Tagen 91 g/l IA produziert.

Zwischen diesen drei Stämmen treten keine größeren Unterschiede im Fermentationsverhalten auf. Die Morphologie der Pilze zeigt ein einheitliches Erscheinungsbild unter diesen Standardbedingungen. Die Endkonzentrationen liegen zwischen 87 und 91 g/l IA. In den Produktivitäten unterscheiden sich die Stämme leicht. Die Produktivität des *A. terreus* LU02b sinkt nach 3 und 4 Tagen von 1,29 g/(lh), die dieser Pilz im Zeitraum zwischen 2 und 3 Tagen aufweist, auf 0,45 g/(lh) nach 4 Tagen. Bisher ist die Ursache hierfür nicht bekannt. Die Stämme NRRL 1960 und 1963 zeigen keine Abnahme nach

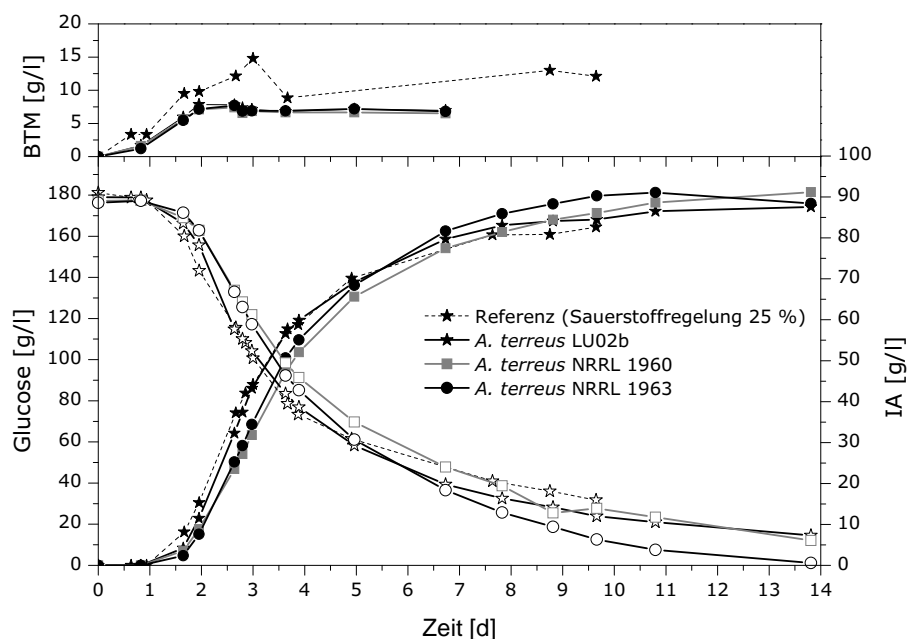


Abbildung 4.48: Kultivierung im 1,5 l Glasfermenter von *Aspergillus terreus* LU02b, NRRL 1960, NRRL 1963 unter Standardbedingungen, 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt

3 Tagen, sondern lediglich nach 4 Tagen Kultivierungsdauer, von 1 g/(lh) auf 0,52 g/(lh) nach 4 Tagen.

Da die maximale Produktivität zu Beginn der Produktionsphase von dem Eigenisolat höher ist, als bei den Stammsammlungsstämmen, kann man keinen der Stämme als den geeignetsten Stamm hervorheben.

4.5 Verdunstungseffekte

Bei der fermentativen Itaconsäureherstellung treten während der vergleichbar langen Kultivierungszeit von 10 Tagen Verdunstungseffekte auf. Diese Effekte sind abhängig von der Kultivierungstemperatur und weiteren Parametern wie z.B. der Begasungsrate, der Feuchtigkeit der Zuluft, der Kühlleistung der Abluftstrecke und der Umgebungstemperatur. Tritt eine hohe Verdunstung auf, ist dies unmittelbar an den Konzentrationsverläufen des Eduktes und Produktes erkennbar. So würde die IA-Konzentration nach dem Erreichen der stationären Phase erneut zunehmen (es wird aufkonzentriert), wohingegen der Glucosegehalt nahezu konstant bleibt bzw. sogar leicht ansteigt. Bei einer industriellen Anwendung würde somit das Produkt am Ende der Fermentation aufkonzentriert, was sich positiv auf die sich anschließende Aufarbeitung auswirken würde. Bei Forschungsarbeiten hingegen ist das Vermeiden größerer Verdunstung bzw. die Kenntnis der Verdunstungshöhe bei den jeweiligen Versuchsansätzen notwendig, da sich die Verdunstung direkt auf die Berechnung von Bilanzen und der Ausbeute auswirken und um die Vergleichbarkeit der eigenen Ergebnisse mit Dritten zu gewähren.

In dieser Arbeit sind alle dargestellten Konzentrationen die tatsächlichen, unkorrigierten, gemessenen Werte, ohne Berücksichtigung eventuell auftretender Verdunstung. Daher wird im Folgenden für jeden Fermentationstyp die jeweilige maximale Verdunstung während der gesamten Fermentationsdauer dargestellt.

Im **Schüttelkolben** wurde vor Beginn der Inkubation das Gewicht des Erlenmeyerkolbens bestimmt. Vor jeder Probenahme wurde der Kolben erneut gewogen und die Gewichts Differenz durch Zugabe von sterilem Reinstwasser (Millipore, Milli Qplus 185) ausgeglichen. Nach jeder Probenahme wurde das Gewicht erneut notiert und dieses diente für den Gewichtsvergleich der nächsten Probenahme. Auf diesem Weg konnte der Fehler durch Verdunstung minimiert werden.

In der **1,5 l Multifermentieranlage** wurde die Kühlung der Abluftstrecke (mittels Kryostat) auf 2 °C eingestellt. Ein volumetrischer Vergleich, unter Berücksichtigung der Probenahmen, zu Beginn und Ende der Fermentation (nach 10 Tagen) ergab maximal einen Verlust von 5 %. Alle Fermentationen im 1 l Maßstab müssen mit diesen 5 % korrigiert werden, um die tatsächlich durch den Pilz produzierten IA-Konzentrationen zu erhalten.

Im **Umwurfreaktor** ist die Begasungsrate um den Faktor 20-30 geringer, als im Rührreaktor. Der Reaktor stand auf einer Waage, so dass das Gewicht zu Beginn, nach jeder Probenahme und nach Abbruch der Kultivierung notiert wurde. Die Abluftstrecke wurde ebenfalls auf 2 °C gekühlt. In diesem Reaktor trat während der gesamten Fermentation eine Verdunstung von 1,6 % auf.

Im **15 l Biostat E Rührkessel** wurde die Abluftstrecke mit Leitungswasser gekühlt. Die Fermentation wurde bei einer Umgebungstemperatur von ungefähr 30 °C durchgeführt, so dass die Temperatur des Leitungswassers vermutlich nicht ausreichte, um eine vergleichbare Kühlung wie in der 1,5 l Multifermentieranlage zu erreichen. Infolge dessen wurde mittels volumetrischem Vergleich zu Beginn und Ende der Fermentation, unter Berücksichtigung der Probevolumina, ein Verdunstungseffekt von 7,5 % ermittelt.

4.6 Preiswerter Rohstoff

Preisgünstige Substrate auf Basis nachwachsender Rohstoffe sollen auf Verwertbarkeit untersucht werden, da aus Kostengründen die Verwendung von Glucose zur industriellen Produktion von Itaconsäure nicht empfehlenswert ist. Der Einsatz preisgünstigerer Alternativen kann zur Effizienzsteigerung des Produktionsprozesses beitragen. In diesem Kapitel wird untersucht, in wie weit die Verwendung von Neben-, bzw Abfallprodukten der Stärkeproduktion, der Herstellung von Maisstärke sowie der Käseherstellung das Wachstum und die Itaconsäureproduktion des Pilzes beeinflussen. Weiterhin wird der Einsatz alternativer Kohlenstoffquellen (Saccharose, Glycerin, Lactose und Xylose) für die IA-Herstellung getestet.

4.6.1 Identifizierung und Analyse von Quellen

Folgende Rohsubstrate wurden näher untersucht:

- **Kartoffel-Restfruchtwasser-Konzentrat:** Dabei handelt es sich um ein Nebenprodukt der Stärkegewinnung (eingedicktes Restfruchtwasser der Kartoffel) welches besonders eiweiß- und mineralstoffreich ist. Analysenwerte bzw. der Nährstoffgehalt einer vorhandenen Probe des Konzentrates der Südzucker AG sind vorhanden (Anhang A.1).
- **Maisquellwasser:** Dieser Rohstoff ist ein Nebenprodukt bei der Herstellung von Maisstärke. Die Analyse einer vorhandenen Probe der Südzucker AG ist vorhanden (Anhang A.2).
- **Rohglycerin:** Es ist ein Abfallprodukt der Biodieselproduktion. Rohglycerin mit Analysenzertifikat der Firma Campa Biodiesel GmbH & Co. KG ist vorhanden.
- **Molke:** Dieses Substrat fällt bei der Käseherstellung an.

4.6.2 Mikrobielle Verwertbarkeit

4.6.2.1 Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen

Es wurden Kultivierungen in Schüttelkolben unter gleichen Bedingungen, Standardproduktionsmedium (Tabelle 3.1, Seite 29) mit 0,04 g/l KH_2PO_4 , aber mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glucose, Saccharose, Pharmaglycerin und Lactose) durchgeführt (Abbildung 4.49).

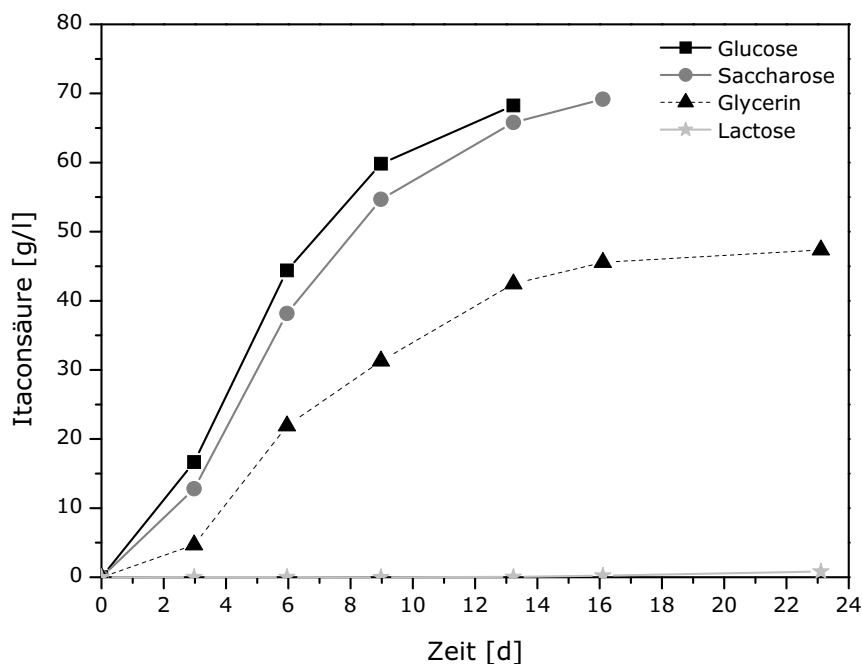


Abbildung 4.49: Vergleich verschiedener C-Quellen; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungerregelt, 120 Upm

Mit Glucose konnte die beste IA-Produktion erzielt werden. Aus 110 g/l Glucose produziert der Pilz nach 13 Tagen 68 g/l IA. Der Pilz ist in der Lage Saccharose zu verwerten und bildet aus 120 g/l Saccharose 69 g/l IA. Er verbraucht Glucose und Fructose parallel, verwertet aber einen höheren Anteil an Glucose, so dass diese nach 13 Tagen vollständig verbraucht ist bei einer gleichzeitigen Fructose Konzentration von 17,8 g/l.

Der Einsatz von Glycerin als Substrat für mikrobiologische Fermentationsprozesse ist interessant, da es als Nebenprodukt bei der Herstellung von Fettsäuren und Biodiesel anfällt. Infolge der zunehmenden Nachfrage und der gesteigerten Produktion von Biodiesel sind die Marktpreise für Glycerin stark gesunken. In diesem Versuch wird zunächst Pharmaglycerin als alleinige Kohlenstoffquelle eingesetzt. Mit dieser Kohlenstoffquelle ist das Wachstum und die Produktion der Itaconsäure langsamer als mit Glucose. Nach 13 Tagen verbraucht der Pilz die vorgelegte Glucose vollständig mit einer molaren Ausbeute von 86 mol% (68 g/l IA). Mit Pharmaglycerin als alleinige Kohlenstoffquelle wurden aber nach gleicher Inkubationsdauer lediglich 60,5 % des eingesetzten Glycerins (114 g/l) verbraucht und zu 42,5 g/l IA umgesetzt (42,7 mol%).

Aspergillus terreus LU02b bildete mit Lactose die dreifache Biotrockenmasse aber lediglich 0,8 g/l IA nach 23 Tagen Kultivierung. Dieser Pilz ist somit in der Lage Lactose als alleinige Kohlenstoffquelle zum Wachstum, aber nicht zu einer hohen IA-Produktion zu nutzen. Folglich ist Molke als alleinige Kohlenstoffquelle nicht einsetzbar.

Im 1,5 l Glasreaktor wurde der Versuch mit Pharmaglycerin als Kohlenstoffquelle wiederholt. Weiterhin wurde die Verwertbarkeit von Xylose als Substrat getestet (Abbildung 4.50).

Mit reinem Pharmaglycerin erfolgt das Wachstum im Fermenter ähnlich wie mit Glucose. Die IA-Produktion setzt hingegen nach ca. zwei Tagen etwas verzögert ein. Die Kurvensteigung während der stärksten Produktbildungsphase ist geringer als bei der Referenz (Standardkultivierung mit Glucose). Nach ca. fünf Tagen nimmt die Produktivität ab und nach 15 Tagen Kultivierungsdauer wird eine Konzentration von 69,7 g/l Itaconsäure erreicht. Die Ausbeute beträgt nach sieben Tagen 69 mol%, infolge des weiteren Substratverbrauchs sinkt sie aber auf 33 mol% nach 15 Tagen ab. Bei dieser Kultivierung im Rührreaktor konnte innerhalb vergleichbarer Kultivierungszeit, vermutlich aufgrund der kontrollierbaren Bedingungen und aktiver Sauerstoffzufuhr, vergleichend zum Schüttelkolben 27 g/l IA mehr produziert werden. Dieses macht den Einsatz von Rohglycerin als Kohlenstoffquelle interessant, mit der Einschränkung, dass dieses meist Salze und andere Verunreinigungen in Konzentrationen enthält, die der Produktivität von *Aspergillus terreus* nicht zuträglich sind.

Das Substrat Xylose (Holzzucker) kann aus Holz oder anderen, aus Cellulosefasern bestehenden Pflanzen wie z.B. Stroh gewonnen werden. Im Reaktor sind zwei Tage nach dem Beimpfen die Sporen nicht ausgekeimt. Da die Keimung bei einer Standardfermentation innerhalb der ersten 15 Stunden stattfindet, sollte die Keimung durch Zugabe von 2 g/l Glucose initiiert werden. Nach drei Tagen wurden weitere 3 g/l Glucose zugesetzt. Nach vier Tagen Kultivierungsdauer sinkt die Gelöstsauerstoffkonzentration und die Keimung der Sporen beginnt. Nach ca. sieben Tagen ist die zugegebene Glucose aufgezehrt, es hat sich ein pH-Wert von 1,9-2,0 eingestellt und der Pilz ist wie bei einer Standardkultivierung

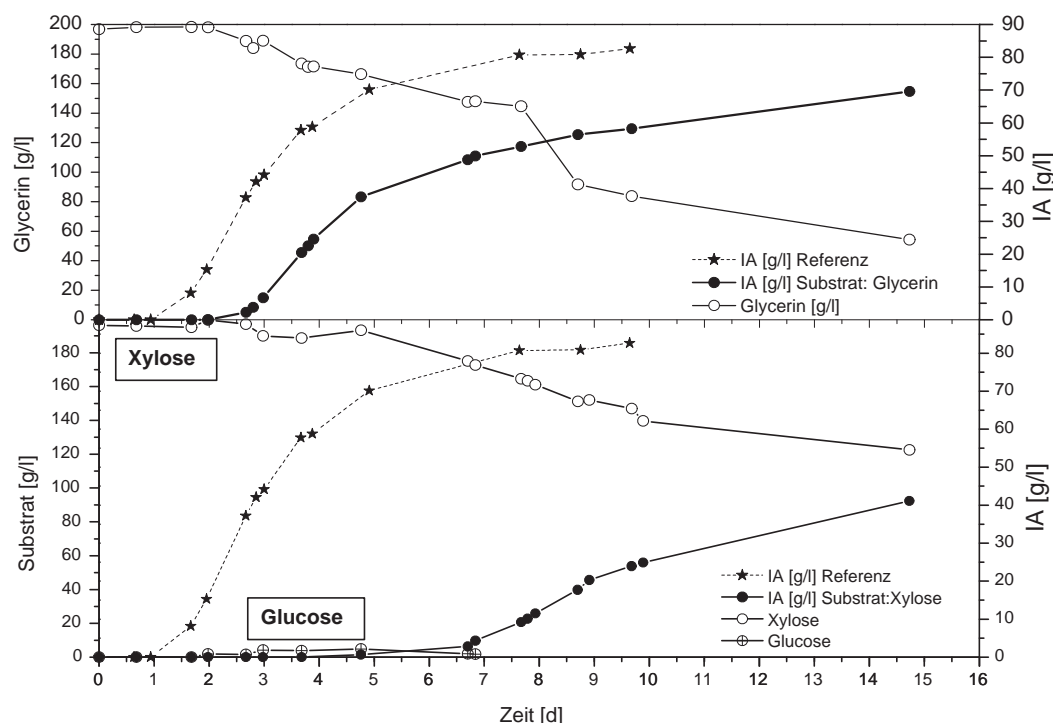


Abbildung 4.50: Vergleich verschiedener C-Quellen; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b im 1,5 l Glasfermenter; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm

in Form von kleinen, locker ausgefransten Pellets gewachsen. Die Phase der stärksten Itaconsäureproduktion beginnt und sinkt nach neun bis 10 Tagen. Nach insgesamt 12 Tagen Produktionsdauer beträgt die Konzentration der Itaconsäure im Medium ca. 45 g/l. Am Verlauf der Xylosekonzentration ist zu erkennen, dass der Pilz den Zucker von Beginn des Wachstums an stetig abbaut. Da trotz der Glucosezugabe am zweiten und dritten Tag der Pilz erst nach über vier Tagen mit dem Wachstum beginnt, kann darauf geschlossen werden, dass nicht zwingend Glucose als Substrat benötigt wird. Vermutlich benötigt der Organismus diese Zeit um den Stoffwechsel auf das Substrat Xylose umzustellen. Im Vergleich sind die Produktivität und die erreichte Endkonzentration deutlich geringer als in einer Kultivierung mit dem Substrat Glucose, dennoch wurde eine Ausbeute von ca. 60 mol% erzielt. Untersuchungen von Kautola haben ebenfalls ergeben, dass *Aspergillus terreus* in der Lage ist organische Säuren aus Xylose herzustellen, jedoch deutlich langsamer als mit Glucose oder Saccharose als Substrat (Kautola et al., 1989). Dies deckt sich auch mit Ergebnissen von Eimhjellen, der mehrere unterschiedliche Zucker und Alkohole auf ihre Eignung als Substrat zur Itaconsäureproduktion untersucht hat. Das beste Wachstum und die stärkste IA-Produktion wurde mit Glucose und Saccharose erzielt, aber auch die Zucker Cellobiose, D-Mannose, D-Fructose, D-Xylose sowie der Alkohol Glycerin stellten sich als taugliche Kohlenstoffquellen heraus (Eimhjellen and Larsen, 1955).

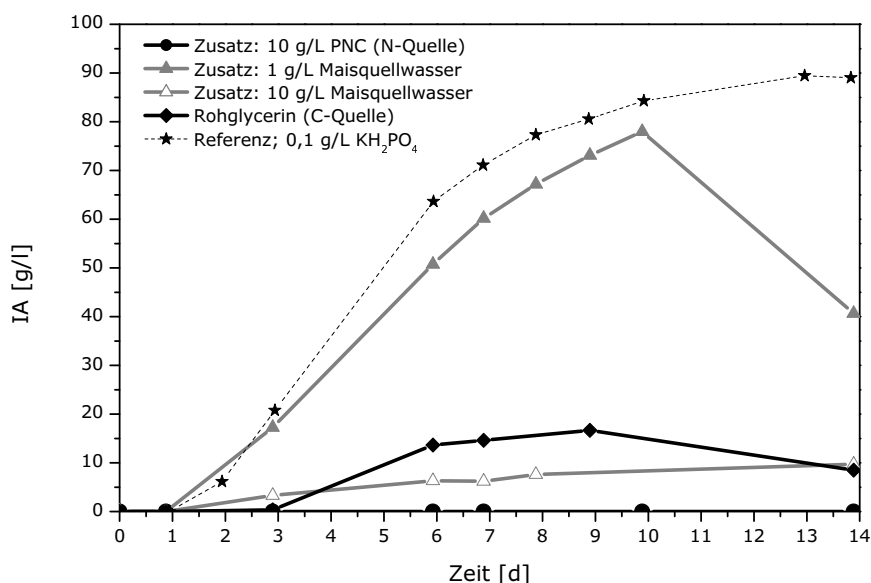


Abbildung 4.51: Einsatz verschiedener Rohsubstrate bei einer Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 unregelt, 120 Upm

4.6.2.2 Verwertbarkeit von Neben- bzw. Abfallprodukten

Der Zusatz von 10 g/l Kartoffelrestfruchtwasser (PNC, als alleinige Stickstoffquelle), 1 bzw. 10 g/l Maisquellwasser sowie Rohglycerin als alleinige Kohlenstoffquelle (Abbildung 4.51) wurden auf ihre Verwertbarkeit durch den Pilz *A. terreus* LU02b untersucht.

Das Kartoffelrestfruchtwasser (PNC) ist besonders eiweiß- (bzw. stickstoff-) und mineralreich und wurde als alleinige Stickstoffquelle eingesetzt. Bei den Kultivierungen mit PNC wurde mehr Biomasse als in der Referenz produziert, aber keine Itaconsäure. Das erhöhte Biomassewachstum ist vermutlich auf das im PNC enthaltene Phosphor zurückzuführen. Vermutlich sind störende Substanzen im PNC enthalten, welche die IA-Produktion vollständig hemmen. Daher ist das Kartoffelrestfruchtwasserkonzentrat als alleinige Stickstoffquelle für die IA-Herstellung nicht geeignet.

Mit Rohglycerin produzierte der Pilz ab drei Tagen Kultivierung IA. Im Vergleich zur Kultivierung mit Glucose war die lag-Phase bis zum Start der IA-Produktion zwei Tage und vergleichend zum Pharmaglycerin einen Tag länger (Abbildung 4.50). Nach neun Tagen Kultivierungsdauer produzierte der Pilz 16,7 g/l IA. Zu diesem Zeitpunkt lagen weitere 27 g/l Glycerin im Medium vor. Am Kultivierungsende waren die vorgelegten 117 g/l Glycerin vollständig verbraucht und der Pilz verstoffwechselt die gebildete IA, was an der Konzentrationsabnahme der IA zum Ende der Kultivierung hin erkennbar ist. Im Vergleich zum reinen Pharmaglycerin (Abbildung 4.49) beträgt die erreichte IA-Konzentration mit 16,7 g/l (13 mol%) lediglich 39 % der im Schüttelkolben produzierten 42,5 g/l IA. Dieser Versuch zeigt, dass der Einsatz von Rohglycerin prinzipiell möglich ist. Da der Pilz aber sehr stark auf Verunreinigungen (Welter, 2000) und Verschiebungen bestimmter Nährstoffverhältnisse (Batti and Schweiger, 1963) reagiert ist eine Analyse des Rohglycerins mit eventuell anschließender Aufreinigung notwendig um geringe Aus-

beuten zu vermeiden.

Maisquellwasser entsteht bei der Herstellung von Maisstärke. Der Einsatz von Maisquellwasser (CSL) ist in der Literatur zahlreich vorhanden (Lockwood and Reeves, 1945) (Okabe et al., 1993) (Dwiarti et al., 2002). So konnte Dwiarti mit einer Mutante von *Aspergillus terreus* NRRL 1960 (nach einer nitrosoguanidine (NTG) Behandlung) unter Verwendung von 2,1 g/l CSL nach 144 h 80 g/l IA herstellen.

A. terreus LU02b produziert mit 10 g/l Maisquellwasser nur 9,7 g/l IA (Abbildung 4.51). Der Zusatz von 1 g/l Maisquellwasser wirkt sich im Bezug der IA-Produktion nicht negativ aus. Der Verlauf der IA-Produktion ähnelt dem Verlauf der Referenz. Der Pilz produziert in den ersten 10 Tagen der Kultivierung 78 g/l IA. Ab diesem Zeitpunkt war keine Glucose mehr messbar und die gebildete IA wurde als Substrat verbraucht und sank während der weiteren Kultivierung.

Da sich der Zusatz von 10 g/l und 1 g/l Maisquellwasser so unterschiedlich in der Produktion auswirkte wurden Versuche mit unterschiedlichen geringen Zusätzen an Maisquellwasser durchgeführt (Abbildung 4.52). Diese Versuchsreihe zeigt, dass die IA-Produktion mit dem verwendeten Stamm und dem Standardproduktionsmedium am besten verläuft, um so geringer die zugesetzten Maisquellwassermengen waren. Mit keinem der Ansätze konnte eine bessere IA-Produktion erreicht werden, als mit dem Standardproduktionsmedium (Referenz; 0,1 g/l KH_2PO_4).

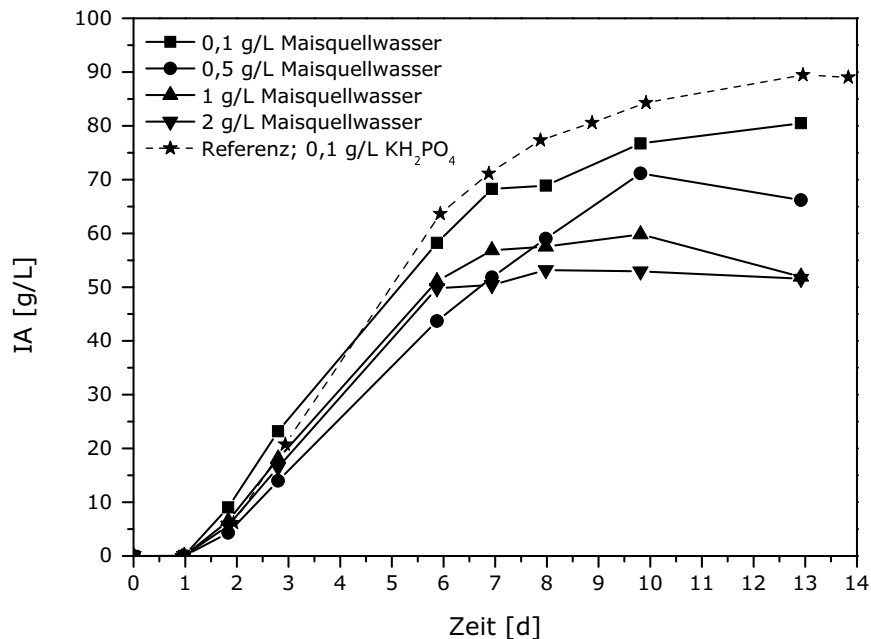


Abbildung 4.52: Zusatz verschiedener Maisquellwasserkonzentration zu dem Standardproduktionsmedium; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm

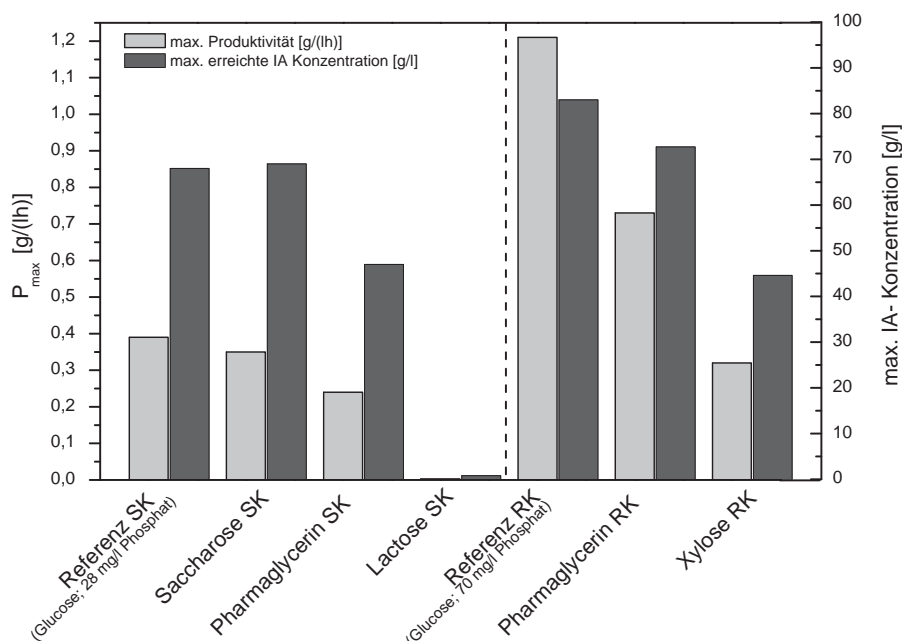


Abbildung 4.53: Übersicht der maximalen Produktivität und der maximal produzierten IA-Konzentration unter Verwendung von alternativen Substraten; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben (SK) sowie 1,5 l Rührreaktor (RK); 33 °C, Start pH 3,1 ungeregelt

4.6.2.3 Diskussion: Einsatz von Alternativsubstraten sowie Neben- bzw. Abfallprodukten

Mit Ausnahme von Lactose kann *A. terreus* LU02b prinzipiell die untersuchten Substrate als Kohlenstoffquelle für das Wachstum und für die IA-Produktion nutzen (Abbildung 4.53). Allerdings konnte weder mit Pharmaglycerin noch mit Xylose eine vergleichbare maximale Produktivität und molare Ausbeuten erzielt werden wie mit reiner Glucose. Lediglich mit Saccharose konnte im Schüttelkolben ein ähnlicher Kultivierungsverlauf wie mit Glucose erzielt werden. Der Einsatz von Glycerin und Xylose könnte dennoch interessant sein und der Einsatz eventuell durch eine Entwicklung einer Fütterungsstrategie möglich sein.

Unter Verwendung der Neben- bzw. Abfallprodukte (Abbildung 4.54) verlief die Itaconsäure Produktion schlechter als mit dem reinen Standardproduktionsmedium (Referenz SK). Kartoffelrestfruchtwasser (PNC), als alleinige Stickstoffquelle, konnte der Pilz zum Wachstum nutzen, aber er produzierte keine Itaconsäure. Mit dem Rohglycerin (Fa. Campa) wurden nur geringe IA-Konzentrationen erreicht und bei Zusätzen des Maisquellwassers (CSL) war die IA-Produktion um so besser je weniger CSL zugegeben wurde. Vermutlich sind in diesen Neben- bzw. Abfallprodukten Substanzen enthalten, welche den Pilz bei der IA-Synthese beeinträchtigen. Daher müssten sie vor dem Einsatz aufgereinigt werden um Verunreinigungen und Schwermetallen wie z.B. Eisen und Mangan abzutrennen. Da dies aber kostenintensiv ist und die Produktion an IA bisher ohne weitere Zusätze und Glucose als Substrat am besten verläuft wurden keine weiteren Versuche

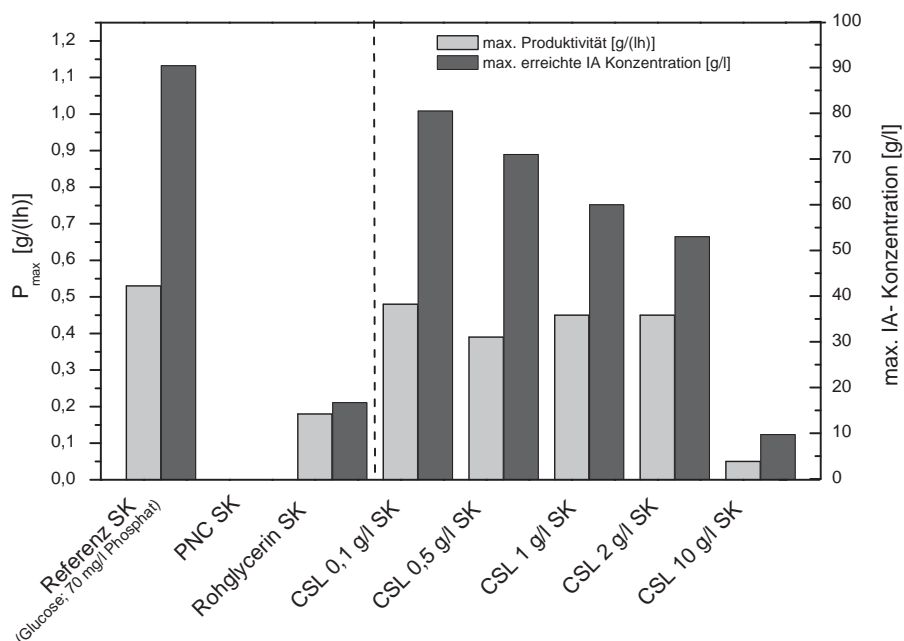


Abbildung 4.54: Übersicht der maximalen Produktivität und der maximal produzierten IA-Konzentration unter Zusatz von Neben- bzw. Abfallprodukten; Kultivierung von *Aspergillus terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben (SK); 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm

mit Rohsubstraten durchgeführt.

4.7 Aufarbeitung der Itaconsäure

Das aufzureinigende Produkt Itaconsäure liegt am Ende der Fermentation in einer wässrigen Mischung zusammen mit nicht umgesetztem Substrat, Nebenprodukten und Pilzmyzel vor. Die Ökonomie des Produktionsprozesses hängt wesentlich von der Entwicklung einer kostengünstigen und effizienten Aufarbeitungsmethode und -strategie ab. Daher wird die Produktaufarbeitung der IA mit verschiedenen Methoden untersucht. Die Aufarbeitung erfolgt vergleichend mit der Elektrodialyse, der Flüssig/Flüssig-Extraktion sowie der Kristallisation.

4.7.1 Elektrodialyse

Die Trennleistung der Elektrodialyse wurde ausgehend von Modelllösungen, Reinstwasser mit Glucose und IA, in realen Kulturbrühen untersucht. Um bei der spannungskonstanten Betriebsweise die Grenzstromdichte dieser Elektrodialyseanlage nicht zu überschreiten wurde sie im Folgenden bestimmt.

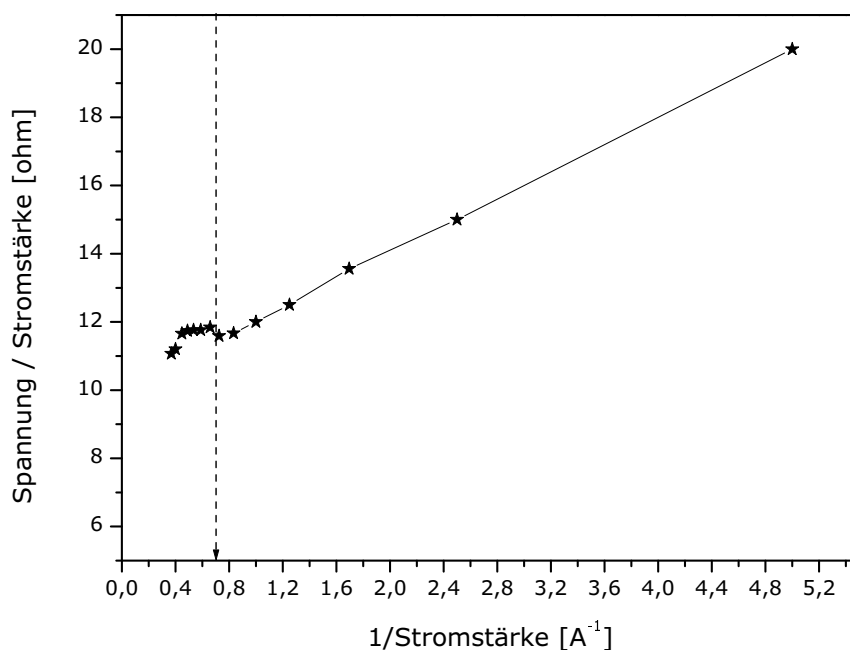


Abbildung 4.55: Bestimmung der Grenzstromdichte der Elektrodialyse Einheit PC Cell ED 1 mit einer Membranfläche von 58 cm^2

4.7.1.1 Bestimmung der Grenzstromdichte

Für die Elektrodialyse Einheit PC Cell ED 1 wurde die Grenzstromdichte für die vorhandene aktive Membranfläche von 58 cm^2 bestimmt (Abbildung 4.55). Die Grenzstromdichte i_{lim} lässt sich grafisch ermitteln und wird bei der verwendeten ED bei $0,7 \text{ A}^{-1}$, bzw. einer Stromstärke von $1,43 \text{ A}$ erreicht. Damit beträgt die Grenzstromdichte (Gleichung 2.4, Seite 21) $i_{lim} 0,0245 \text{ A/cm}^2$. Die Grenzstromspannung bei einer Betriebsweise unter konstanter Spannung beträgt bei $1,43 \text{ A}$ $16,9 \text{ V}$.

Alle weiteren Versuche werden bei einer konstanten Spannung von 15 V durchgeführt, um sicher zu gehen, dass weder Elektroosmose einsetzt noch die Membranen zerstört werden. Bei einer Betriebsspannung von 15 V liegt pro Membran eine Spannung von $1,36 \text{ V}$ an, was in dem Bereich von $1\text{-}1,5 \text{ V}$ pro Membran liegt (Strathmann and Chmiel, 1984).

4.7.1.2 Elektrodialyse der Modelllösungen

Die Modelllösungen bestehen aus unterschiedlichen Massenverhältnissen des Substrats Glucose zu dem Produkt Itaconsäure um den Einfluss der Produktkonzentration auf die Trennleistung zu untersuchen.

Während des Elektrodialyse-Prozesses fällt die IA-Konzentration im Diluat stetig ab und nimmt im Konzentrat zu (Abbildung 4.56). Da zu Beginn bzw. am Ende des ED-Prozesses die IA-Konzentration auf der Diluatseite bzw. auf der Konzentratseite sehr hoch ist, wird die Diffusion von IA-Molekülen entlang des Konzentrationsgradienten induziert. Der Effekt trägt dazu bei, dass die vollständige Anreicherung von IA im Konzentrat nicht

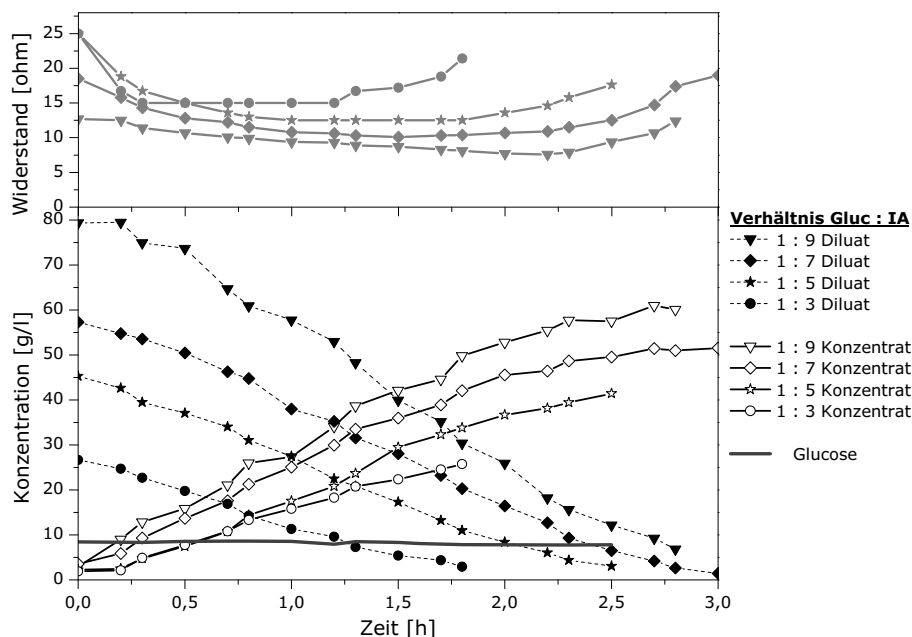


Abbildung 4.56: Elektrodialyse mit Modellösungen, bestehend aus Glucose und Itaconsäure; 1l Diluat, 1l Konzentrat, 15V; Konzentrationsverlauf Itaconsäure im Diluat (geschlossene Symbole) und im Konzentrat (offene Symbole); Widerstandsverläufe

erfolgen kann. Weiterhin treten Verluste von Itaconsäure aufgrund der Verdünnung im System (Schläuche) und durch in den Membranen verbleibende Restmoleküle auf.

Der Widerstand im System weist zu Beginn und gegen Ende des ED-Prozesses die höchsten Werte auf. Zu diesen Zeitpunkten ist die Flüssigkeit in den Grenzschichten auf einer Seite der Membran arm an ionischen Ladungsträgern (IA) für den Stromtransport. Die Leitfähigkeit der betreffenden Flüssigkeit fällt stark ab, somit steigt der Widerstand der im betreffenden Kompartiment enthaltenen Flüssigkeit. Stagniert die Leitfähigkeit im Diluat bzw. steigt der Widerstand des Systems stark an, ist der Hauptteil des Produktes (IA-Moleküle) übergegangen und der ED-Prozess kann beendet werden (Moresi and Sappino, 2000) (Rapp, 1995). Bei spannungskonstanter Betriebsweise nimmt die Dauer des ED-Prozesses mit steigender Konzentration an IA in der Vorlage zu. Ab 70 g/l Itaconsäure werden ca. 3 h benötigt.

Die Versuche haben gezeigt, dass eine Trennung des Produktes IA von ungeladenen Komponenten, z.B. dem Substrat Glucose möglich ist. Die Konzentration von Glucose bleibt im Diluatkreislauf konstant. Das neutrale Molekül wird vom elektrischen Feld nicht beeinflusst.

Zur Bewertung der Trennleistung wurden die Kennzahlen der ED für die Itaconsäure ermittelt (Kapitel 2.3.1.3, Seite 22) und in der Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Die Elektrodialyse Zeit sowie der Energiebedarf (Tabelle 4.3) nimmt mit steigender IA-Konzentration zu. Je länger der ED-Trennprozess dauert, desto höher ist der Energieverbrauch der Anlage, das Spannungspotenzial muss aufrecht erhalten werden. Die spezifische Energie, pro übergegangenes Kilogramm IA, sinkt hingegen aufgrund der höheren

Tabelle 4.3: Kennzahlen der Elektrodialyse mit Modelllösungen bestehend aus Glucose und IA, bei 15 V (konstant)

Parameter		Modelllösungen			
		1:3	1:5	1:7	1:9
Zeitdauer	[h]	1,83	2,5	3	2,83
$c_{IA, \text{Beginn}}$ Diluat	[g/l]	26,7	45,3	57,3	79,4
$c_{IA, \text{Ende}}$ Diluat	[g/l]	2,9	3,1	1,4	6,7
Δc Diluat	[mol/l]	0,18	0,32	0,43	0,56
RZA	[mmol/(lh)]	99,8	130	143,3	196,9
Energie	[Wh]	24,9	39,8	55,8	67,4
Spez. Energie e	[kWh/kg]	1,05	0,94	0,99	0,93
Konversionsgrad		0,89	0,93	0,97	0,91

ionischen Fracht, die für den Übergang zur Verfügung steht. Das Verhältnis von Trennpotenzial und transportierter Stoffmenge an IA nähert sich an. Der Konversionsgrad als Maß für den Übergang der Itaconsäure beträgt bei allen Versuchen ca. 0,9. Bei dem Einsatz von höheren IA-Konzentrationen können bei steigendem Energie- und Zeitverbrauch gleiche Konversionsgrade für den Übergang von Itaconsäure vom Diluat in das Konzentrat erzielt werden.

4.7.1.3 Elektrodialyse des Kulturüberstandes

Bei der Elektrodialyse realer Kulturbrühen wurde nach einer Fermentation mit dem Standardmedium die Biomasse abzentrifugiert, so dass der Kulturüberstand das Produkt (IA), das nicht umgesetzte Substrat (Glucose) und weitere Nebenprodukte und Bestandteile (Ionen) des Mediums enthielt.

- **Einfluss von Nebenprodukten (Kulturüberstand)**

Am Kultivierungsende werden IA-Konzentrationen von ca. 90 g/l erreicht, so dass dieser Versuch mit der realen Fermentationsbrühe mit der Modelllösung 1:9 (10 g Glucose + 90 g IA pro Liter) vergleichbar ist.

Im Diluatkreislauf des Kulturüberstandes (KÜB) (Abbildung 4.57) verbleibt eine höhere IA-Restkonzentration als bei der vergleichbaren Modelllösung. Dementsprechend ist die Anreicherung von IA im Konzentratkreislauf etwas geringer. Der Widerstand fällt bei der Elektrodialyse mit KÜB nach Beginn der Elektrodialyse stark auf einen minimalen Wert ab und steigt anschließend kontinuierlich an. Im Kulturüberstand sind unterschiedliche ionische Bestandteile aus dem Medium stammend sowie Stoffwechselprodukte (z.B. organische Säuren) vorhanden. Der Durchtritt eines Ions durch eine Membran ist neben der Ionenmobilität auch vom äußeren Feld, sowie von der Größe und der Ladung des Moleküls abhängig (Atkins, 1984). Daher wird der Stromtransport zunächst durch kleine Ionen (z.B. Chloridion) übernommen, was den schnellen Abfall des Widerstandes bedingt.

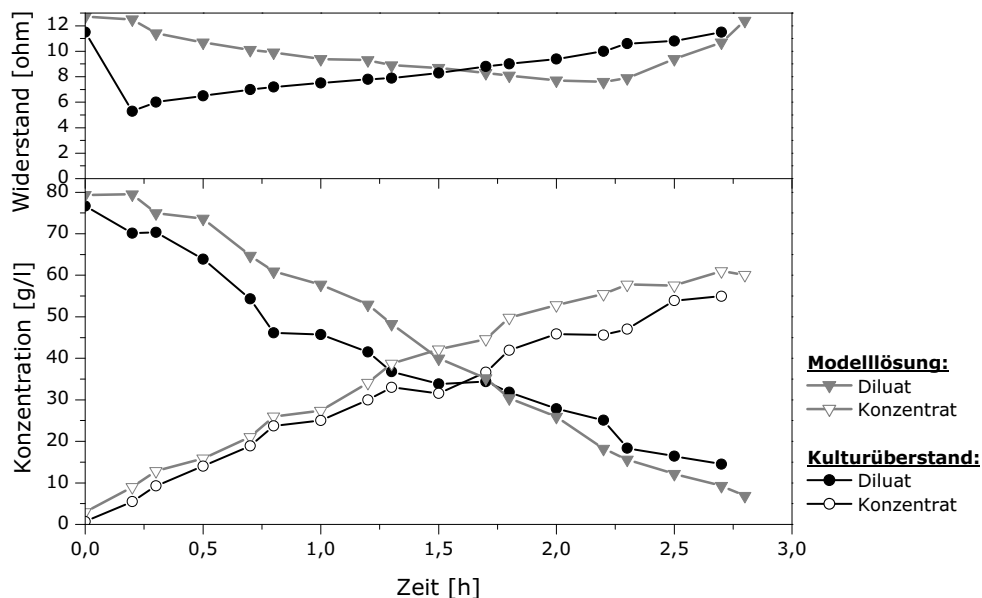


Abbildung 4.57: Elektrodialyse eines biomassefreien Kulturüberstandes im Vergleich zu einer Modelllösung, bestehend aus Glucose und IA; 1 l Diluat, 1 l Konzentrat, 15 V, Konzentrationsverlauf von Diluat (geschlossene Symbole) und Konzentrat (offene Symbole), Widerstandsverläufe

• Aufkonzentrierung von Itaconsäure

Die Variation von Diluat- zu Konzentratvolumen in dem Verhältnis 2:1 ergibt die Möglichkeit der Aufkonzentrierung von Itaconsäure. Es wurde von dem Diluatvolumen (0,8 l) in das halbe Flüssigkeitsvolumen des Konzentrats (0,4 l) aufkonzentriert (Abbildung 4.58).

Von der IA-Anfangskonzentration im Diluat (ca. 60 g/l) wurde eine Aufkonzentrierung im Konzentrat um 25 % auf 80 g/l Itaconsäure erreicht. Im Diluat verbleiben ca. 10 g/l Itaconsäure. Die Vorlage der halben Flüssigkeitsmenge im Konzentratkreislauf hat zu Folge, dass sich während des ED-Prozesses der Konzentrationsgradient zwischen Konzentrat und Diluat im Vergleich zu den anderen Versuchen verstärkt. Der Transport von IA in das Konzentrat wird zusätzlich erschwert, es tritt der Effekt der Rückdiffusion auf.

Bei diesem Versuch wurde die Volumenänderung des Diluates gravimetrisch ermittelt. Das Diluatvolumen nimmt stetig ab. Der Transport von elektrisch geladenen Komponenten über die Ionenaustauschermembranen induziert einen gleichgerichteten Fluss von Wassermolekülen, da die Hydrathüllen der Ionen mitbewegt werden (Elektroosmose). Gleichzeitig kommt es aufgrund der ansteigenden IA-Konzentration im Konzentratkreislauf zu einer Überlagerung dieses Effektes durch Osmose von Wassermolekülen (Ling et al., 2002). Der Wassertransport über die Membranen ist proportional zur Stromdichte, aber bei spannungskonstanter Betriebsweise treten Schwankungen in der Stromdichte auf, weshalb die Kurve nicht linear verläuft. Insgesamt betrachtet verringert sich mit der transportierten ionischen Fracht vom

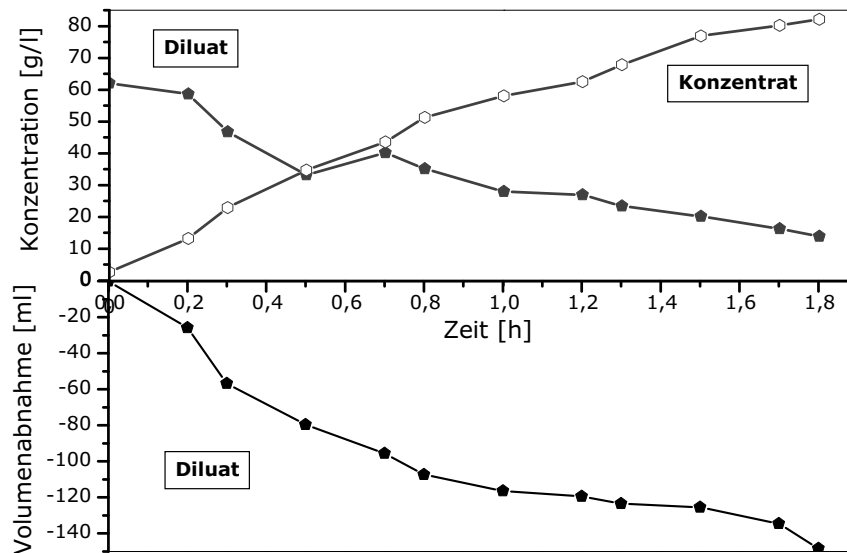


Abbildung 4.58: Elektrodialyse eines biomassefreien Kulturüberstandes zur Aufkonzentrierung der IA im Konzentrat, 0,8 l Diluat, 0,4 l Konzentrat, 15 V

Diluat ins Konzentrat auch der Wassertransport.

Verglichen mit der Modelllösung ergeben sich folgende Kennzahlen für diesen Elektrodialyse-Prozesse mit unterschiedlichen Diluat- und Konzentratvolumen (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Kennzahlen aller Elektrodialyse Versuche mit Kulturüberstand, bei 15 V (konstant)

Parameter		KÜB 1 l	KÜB _{AUFK}	1:9
Zeitdauer	[h]	2,67	1,83	2,83
$c_{IA, \text{Beginn}}$ Diluat	[g/l]	76,7	62,1	79,4
$c_{IA, \text{Ende}}$ Diluat	[g/l]	14,5	13,9	6,7
Δc Diluat	[mol/l]	0,48	0,37	0,56
RZA	[mmol/(lh)]	179,4	202	196,9
Energie	[Wh]	75,4	56,6	67,4
Spez. Energie e	[kWh/kg]	1,2	1,2	0,93
Konversionsgrad		0,81	0,78	0,91

Bei dem Einsatz eines Diluatvolumens von einem Liter ist der Konversionsgrad (KVG) bei dem realen KÜB (0,81) wesentlich geringer als bei den vergleichbaren Versuchen mit Modelllösungen (0,9). Durch den Transport der gesamt vorliegenden Ionenfracht einschließlich Itaconsäure verringert sich der KVG gegenüber IA. Im Vergleich von dem Versuch KÜB 1 l und der Modelllösung mit dem Glucose/IA-Verhältnis von 1:9 ist eine wesentlich geringere RZA (179,4 mmol/(lh)) als bei der Modelllösung (196,9 mmol/(lh)) ermittelt worden. Es ist während der gleichen ED-Zeitdauer weniger Itaconsäure bei dem Einsatz von KÜB in das Konzentrat überge-

gangen. Bei der Elektrodialyse mit Kulturüberstand stehen alle ionischen Komponenten gleichzeitig in Konkurrenz zur Itaconsäure um den Transportvorgang in das Konzentrat. Für den Versuch zur Aufkonzentrierung ($KÜB_{AUFK}$) von IA wurden 0,8 l Kulturüberstand als Diluat und die halbe Flüssigkeitsmenge (0,4 l) Wasser als Konzentrat vorgelegt. Dabei wurde ein KVG von ca. 0,8 erreicht. Die spezifisch benötigte Energie beträgt für die Aufkonzentrierung 1,2 kWh/kg IA.

• Qualitative Bewertung der Elektrodialyse

Mittels Auswertung von Chromatogrammen des UV-Detektors (Wellenlänge: 210 nm) des HPLC-Systems kann die Bewertung eines ED-Prozesses in Bezug auf die Qualität erfolgen. Die auf der Grundlage dieser Analytik detektierten Nebenprodukte werden betrachtet. In der Abbildung 4.59 sind die entsprechenden Chromatogramme einer Nullprobe, einer Endprobe aus dem Diluat und Konzentrat eines Versuches mit Kulturüberstand zusammengestellt.

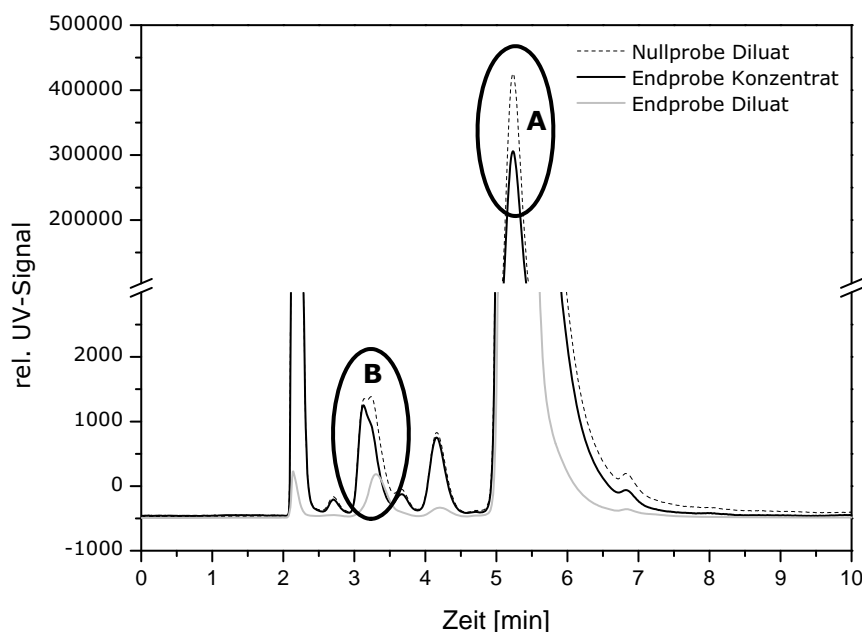


Abbildung 4.59: Chromatogramme einer Elektrodialyse im Vergleich; Null- und Endprobe des Diluates sowie die Endprobe des Konzentrates; UV-Detektor; Säule: Fermentation Monitoring BioRad; 0,8 ml/min, 25 °C; 5 mM H₂SO₄

In der Fermentationsbrühe am Ende einer Kultivierung liegen Ionen vor, die aus dem Medium stammen, sowie das Haupt-(IA) und sämtliche Nebenprodukte des vom Mikroorganismus durchgeführten Biosyntheseweges. Bonnarme und Mitarbeiter haben Metabolite des Tricarbonsäurezyklus quantifizieren können: Citrat, cis-Aconitat, Oxalacetat, Fumarat, Succinat, α -Ketoglutarat und Itaconsäure (Bonnarme et al., 1995). Es kann somit angenommen werden, dass alle organischen Säuren in dissoziierter Form in Konkurrenz zur Itaconsäure stehen um die Migration durch die Ionenaustauschermembranen der Elektrodialyse. Es kann qualitativ festgestellt

werden, dass in das Konzentrat außer dem Zielmolekül Itaconsäure (A; Retentionszeit: ca. 5 Minuten) auch andere Nebenprodukte in das Konzentrat übergegangen sind. Hierzu zählen die vom Stoffwechsel außer IA produzierten organischen Säuren und geladene Komponenten (Ionen), die aus dem Medium stammen. Der Übergang von Itaconsäure ist aufgrund geringer Restmengen im Diluat unvollständig erfolgt. Der mit B markierte Bereich zeigt einen Doppelpeak. Nach einer Retentionszeit von ca. 3,2 Minuten wurden Ketoglutarsäure und Gluconsäure in der Nullprobe als Doppelpeak detektiert. In der Endprobe des Konzentrats ist Ketoglutarsäure als einzelner Peak erkennbar, das Plateau des Doppelpeaks taucht als einzelner kleinerer Peak in der Endprobe des Diluates auf. Es kann somit angenommen werden, dass Ketoglutarsäure eine höhere Ionenmobilität als Gluconsäure besitzt, da im Konzentrat die Peakhöhe dieser in der Nullprobe entspricht und daher diese Substanz nahezu vollständig in das Konzentrat übergegangen ist. Im Gegensatz dazu ist der entsprechende Peak für Gluconsäure nur ca. halb so hoch wie in der Nullprobe, was auf eine wesentlich längere Übergangsdauer hindeutet.

4.7.2 Flüssig/Flüssig-Extraktion

Der Erfolg der Reaktivextraktion von Itaconsäure setzt sich aus drei Schritten zusammen:

1. Bildung eines Zwischenproduktes (Komplexes)
2. Solvatation des Komplexes in die organische Phase
3. Reextraktion der IA aus der organischen Phase

Über verschiedene Versuchsansätze wird das kombinierte Extraktionsmittelsystem bestehend aus den Lösungsmitteln 1-Butanol, 1-Octanol und Decanol sowie der Reaktivkomponente Trioctylamin durch Variation der Verhältnisse zueinander optimiert. Weiterhin wird die Extraktionsdauer, die Temperatur, die Reextraktion sowie der Einsatz realer Kulturbrühen mit und ohne Pilzmyzel untersucht. In wie fern der Pilz auf Spuren der unterschiedlichen Lösungsmittel reagiert ist weiterhin Gegenstand dieser Arbeit.

4.7.2.1 Optimierung des molaren Amin/Säure-Verhältnisses sowie der Amin-/Alkohol-Massenverhältnisse

1. Optimierung des molaren Amin/Säure-Verhältnisses

Die Optimierung der Wechselwirkungen zwischen Itaconsäure und der Reaktivkomponente (Trioctylamin) wurde unter konstanten TOA/Butanol Massenverhältnisses (0,2 g/g) durchgeführt (Abbildung 4.60).

Der Gesamterfolg der Extraktion nimmt mit steigendem Anteil der Reaktivkomponente unter dem gegebenen Amin/Alkohol-Verhältnis sehr stark zu. Ist die molare Beladung von Trioctylamin zur Itaconsäure gleich oder größer als eins, liegt der Extraktionserfolg (Konversionsgrad der Extraktion) bei über 98 %. Eine weitere

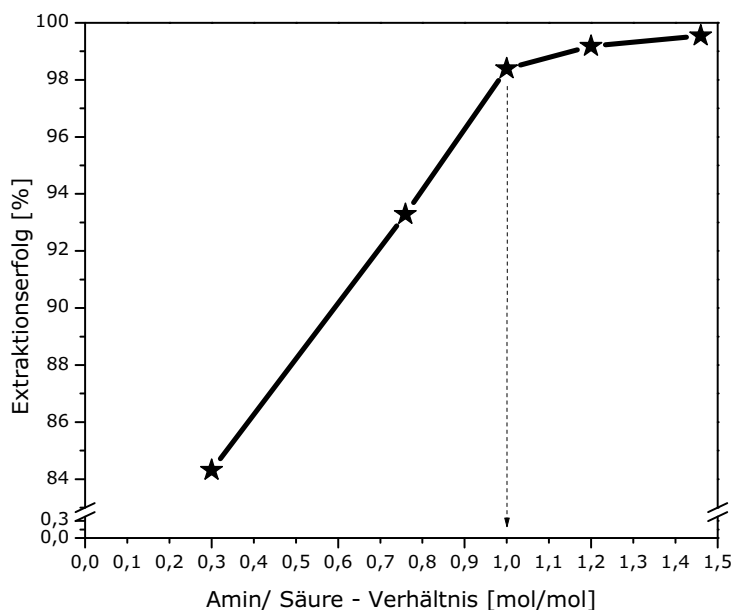


Abbildung 4.60: Optimierung des Amin/Säure-Verhältnisses bei konstantem Amin/1-Butanol-Massenverhältnis

Erhöhung des Aminanteils bewirkt lediglich eine geringe Steigerung des Extraktionserfolges. Das nach diesem Versuch ermittelte minimale Amin/Säure-Verhältnis beträgt 1,0. Unter diesen Bedingungen werden 98,39 % der eingesetzten Menge an Itaconsäure erfolgreich in die organische Phase extrahiert. Anhand der Ergebnisse von Tamada zur Komplexbildung wird festgestellt, dass die Reaktivkomponente (TOA) mit Itaconsäure-Molekülen (1,1)-Komplexe bildet (Tamada and King, 1990). Ein IA-Molekül geht somit mit einem TOA-Molekül Wechselwirkungen ein und wird gebunden. In Hinsicht auf die Umweltverträglichkeit und Toxizität der Substanzen, insbesondere von Trioctylamin, ist der Anteil der Reaktivkomponente so gering wie möglich anzustreben.

2. Optimierung des Amin/Alkohol-Massenverhältnisses

Diese Versuchsreihe soll die maximal erreichbare Synergie zwischen dem Komplex und den Lösungsmitteln 1-Butanol, 1-Octanol und Decanol bei konstanter Aminmenge ermitteln. Der gebildete Amin/Säure-Komplex wird durch das Lösungsmittel solvatisiert. Das Verhältnis zwischen den vorhandenen Komplexen und den Lösungsmitteln bestimmt als zweiten Einflussfaktor den Gesamterfolg und damit den Konversionsgrad der Extraktion (Abbildung 4.61).

Die Extraktion mit reinen Alkoholen zeigt, dass mit zunehmender Kettenlänge der Alkohole die Extraktion schlechter verläuft. Mit reinem Decanol wird lediglich ein Itaconsäureübergang von 30 % erreicht. Somit ist eine Reaktivkomponente nötig um eine ausreichende Verteilung der Itaconsäure in der Lösungsmittelphase und schließlich einen hohen Extraktionserfolg zu erreichen. Unabhängig von der Kettenlänge des Alkohols reicht ein Amin/Alkohol-Massenverhältnis von 0,1 aus um

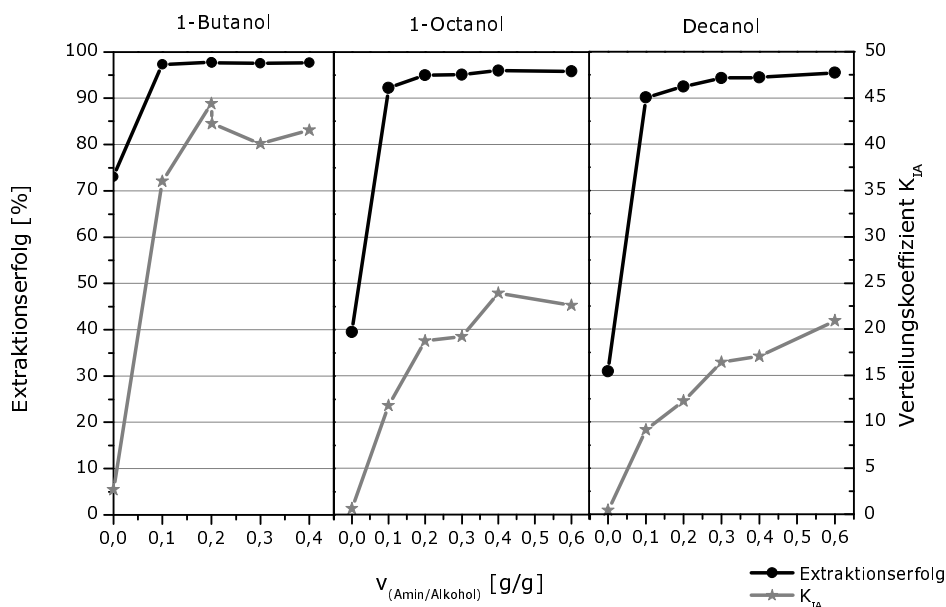


Abbildung 4.61: Optimierung des Amin/Alkohol-Verhältnisses bei konstantem Amin/Säure-Molverhältnis

über 92 % der Itaconsäure von der wässrigen in die organische Phase zu überführen. Bei höheren Verhältnissen liegt der Extraktionserfolg relativ konstant bei ca. 95 % und bei 1-Butanol bei 98 %. Der Verteilungskoeffizient der IA steigt mit zunehmendem Amin/Alkohol-Massenverhältnis an. Im Hinblick auf die Umweltverträglichkeit der Reaktivkomponente und des gleichbleibenden Extraktionserfolgs wird für die Folgeversuche ein konstantes Amin/Alkohol-Massenverhältnis von 0,2 gewählt.

4.7.2.2 Optimierung der Temperatur und der Extraktionsdauer

Die Dauer der Phasendurchmischung / Extraktionsdauer liefert einen Beitrag zur Effizienz der Extraktion. Eine sehr kurze Mischzeit von ca. fünf Sekunden reicht scheinbar nicht für einen ausreichenden Kontakt der Phasen um einen Übergang der Itaconsäure herzustellen (Abbildung 4.62). Eine Verlängerung der Durchmischung auf zwei Minuten zeigt hingegen einen hinreichend hohen Extraktionserfolg, der durch längere Mischzeiten (20 Minuten) nicht weiter erhöht wird.

Der Extraktionserfolg ist im Bereich von 25 bis 40 °C weitestgehend Temperatur unabhängig. Die Extraktionstemperatur kann daher in diesem Bereich niedrig gewählt werden.

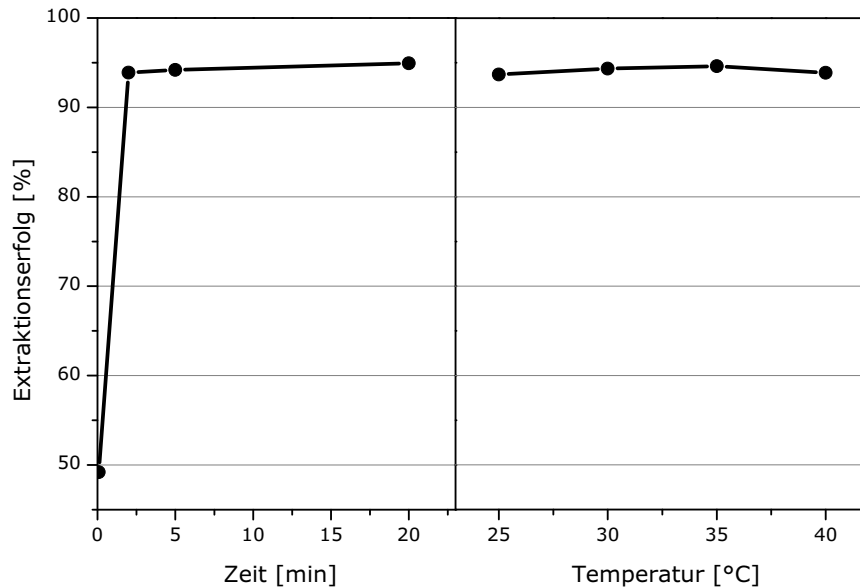


Abbildung 4.62: Reaktivextraktion mit TOA/1-Octanol (0,2 g/g), Variation der Parameter: Extraktionsdauer bei 40 °C; Temperatur bei 2 Minuten, $\nu_{M(Amin/Säure)} = 1$, $V_{wässrig} = V_{organisch}$, Modelllösung mit 61,25 g/l Itaconsäure und 19 g/l Glucose

4.7.2.3 Einsatz des Extraktionssytemes bei realen Fermentationsbrühen

Die Extraktionsparameter wurden anhand von Modelllösungen optimiert, die lediglich Itaconsäure und Glucose enthielten. Die Einsetzbarkeit dieser Aufarbeitungsmethode wurde anschließend mittels realer Kulturbrühen getestet. Zum Einen wurde das Extraktionssystem TOA/1-Butanol an realen Kulturüberständen mit und ohne Biomasse untersucht und zum Anderen das optimierte TOA/1-Octanol System (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Extraktion (TOA/1-Butanol und TOA/1-Octanol) von Itaconsäure aus biomassefreiem Kulturüberstand KÜB sowie aus Kulturbrühe mit Biomasse im Vergleich zu Modelllösungen; $\nu_{M(Amin/Säure)} = 1$, $V_{wässrig} = V_{organisch}$

	Zeit [min]	T [°C]	$\nu_{m(Amin/Alkohol)}$	Extraktionserfolg [%]
KÜB	20	40	TOA/Butanol 0,2	88,21
Kulturbrühe mit Biomasse	20	40	TOA/Butanol 0,2	94,14
Modelllösung	20	40	TOA/Butanol 0,2	98,31
KÜB	2	25	TOA/Octanol 0,2	85,25
Modelllösung	2	25	TOA/Octanol 0,2	93,69

Bei Einsatz realer Kulturüberstände wird die IA mit dem TOA/1-Butanol Extraktionssystem zu 88,21 % in die organische Phase extrahiert. Bei Vorlage von Kulturbrühe

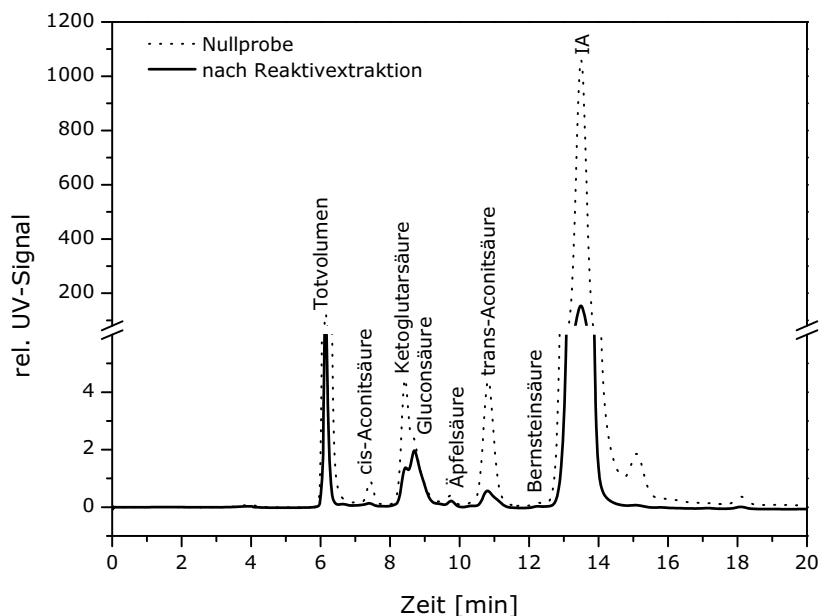


Abbildung 4.63: HPLC-Chromatogramm (UV-Detektor) einer Fermentationsbrühe vor und nach der Reaktivextraktion, TOA/1-Octanol 0,2 g/g, $\nu_{M(Amin/Säure)} = 1$, $V_{wässrig} = V_{organisch}$ 2 Minuten Durchmischungsdauer, 25 °C

mit Biomasse direkt aus dem Fermenter beträgt der Extraktionserfolg ca. 94 %. Somit wird ca. 6 % mehr Itaconsäure extrahiert, wenn die Biomasse vor der Extraktion nicht von der Kulturbrühe abgetrennt wird. Im Vergleich zu den erreichten Extraktionserfolgen bei den Modellversuchen ergibt sich insgesamt betrachtet folgende Reihenfolge: Der geringste Extraktionserfolg ergibt sich beim Einsatz von Kulturüberstand mit 88 %, bei der Kulturbrühe mit Biomasse konnten ca. 94 % erreicht werden und 98 % Itaconsäure wurden aus den Modelllösungen extrahiert.

Die Übertragung der optimierten Reaktivextraktion mit TOA/1-Octanol auf eine zellfreie Fermentationsbrühe erbrachte mit ca. 85 % ebenfalls einen deutlich herabgesetzten Extraktionserfolg.

Bei der Extraktion wird keine vollständige Abtrennung der Itaconsäure erreicht (Abbildung 4.63). In der Kulturbrühe sind neben Itaconsäure die Metabolite vorhanden, die auf den von *A. terreus* durchgeführten Stoffwechselwegen entstehen. Darunter sind die im Tricarbonsäurezyklus gebildeten organischen Säuren (Abbildung 2.3, Seite 8). Bei dem Extraktionsprozess treten Wechselwirkungen von Trioctylamin zu allen Verbindungen auf, die Carboxylgruppen tragen und es kann zur Bildung von verschiedensten Komplexen kommen (Hirth et al., 2002). Offensichtlich bindet Trioctylamin unter diesen Bedingungen bevorzugt Itaconsäure-Moleküle. Allerdings wird der Konversionsgrad bezogen auf Itaconsäure gemindert durch die konkurrierenden organischen Säuren, die ebenfalls extrahiert werden können.

In weiteren Versuchen muss geklärt werden, ob die Abtrennung der Biomasse vor der Extraktion überhaupt erforderlich ist. Der Konversionsgrad bei Verwendung von Kul-

turbulenz ist höher als bei biomassefreiem Kulturüberstand. Ursache kann sein, dass die Biomasse durch die aufgebrachten Scherkräfte des Rührers zerrissen und in der Lösung als feste Teilchen suspendiert wird. Es vergrößert sich die Stoffaustauschfläche zwischen der organischen und wässrigen Phase. Beim Zerbersten der Hyphen-Zellen wird wahrscheinlich auch intrazellulär im Cytoplasma lokalisierte Itaconsäure frei, die somit bei der Extraktion zur Verfügung steht.

Bei allen Versuchen ist beobachtet worden, dass die Phasenkoaleszenz im Scheidetrichter sehr lange dauert. Da insbesondere Hydroxycarbonsäuren zur Emulsionsbildung neigen, kann eine Beeinflussung der Phasenseparation durch Maßnahmen wie Temperaturerhöhung oder Zugabe von Elektrolytzusätzen erforderlich sein (Hirth et al., 2002).

4.7.2.4 Untersuchung der Reextraktion

Nach der Extraktion befindet sich die Itaconsäure in der organischen Phase. Eine Abtrennung der organischen Säure auf destillativem Weg wäre aufgrund des hohen Siedepunkts von TOA (366 °C) nur durch kostenintensive Hochvakuumrektifikation möglich (Hirth, 2003). Daher wird untersucht, in wie fern die Säure durch Rückextraktion in eine konzentrierte wässrige Phase möglich ist.

Der Siedepunkt des Lösungsmittels 1-Octanol liegt bei 194 °C. In dieser Versuchsreihe wird der von Jung empfohlene Eindampfungsschritt nicht durchgeführt (Jung et al., 2000). Die gesamte organische Phase der Reaktivextraktion wird mit dem gleichen Volumen einer wässrigen, stark basischen Ammoniaklösung (\sim pH 10) in Kontakt gebracht. Das Reextraktionsverhalten der Itaconsäure in diese wässrige Phase wird bei unterschiedlichen Ammoniakkonzentrationen und Temperaturen untersucht (Abbildung 4.64).

Die Reextraktion der Itaconsäure mit wässriger Ammoniaklösung aus dem Extraktionsmittel TOA/1-Octanol erzielte im Bereich von 25-65 °C bei 30 g/l Ammoniak in der wässrigen Phase einen maximalen Reextraktionserfolg von 65,3 % . Die Ammoniakkonzentration sollte mindestens 20 g/l betragen, um über 60 % der Itaconsäure aus der organischen Phase zurück zu gewinnen. Konzentrationen über 30 g/l bringen keine Verbesserung des Extraktionserfolges. Die Mischungsdauer der Reextraktion betrug 20 Minuten. Eine Verlängerung auf 60 Minuten zeigte keine Veränderung im Extraktionsergebnis.

In der Literatur werden weitere Möglichkeiten der Rückgewinnung ohne vorherige Abtrennung des Lösungsmittels vorgeschlagen. Puttemans untersuchte die Rückextraktion organischer Säuren aus TOA-Komplexen mittels Austauschreaktion durch Perchlorationen (Puttemans et al., 1984b). Die Verwendung eines niedermolekularen, flüchtigen tertiären Amins (Trimethylamin (TMA)) anstelle von Ammoniak erzielte hervorragende Ergebnisse bei der Rückextraktion von Milch-, Succinat- und Fumarsäure aus einer organischen Extraktphase. Zur Extraktion wurde eine Gemisch aus Alamin 336 (tertiäres Amin, C8-C10) und Methyl-Isobutyl-keton im Massenverhältnis 1,32 g/g verwendet. Acht Teile dieser, mit Säure beladenen organischen Phase wurden mit 3 Teilen der wässrigen TMA-Lösung bei 25 °C in Kontakt gebracht. Bei einem TMA/Säure-Molverhältnis von 2 g/g konnten 100 % der Säure aus der organischen Phase rückextrahiert werden (Poole and King, 1991). Eine Reextraktion der Itaconsäure mittels TMA müsste vergleichend

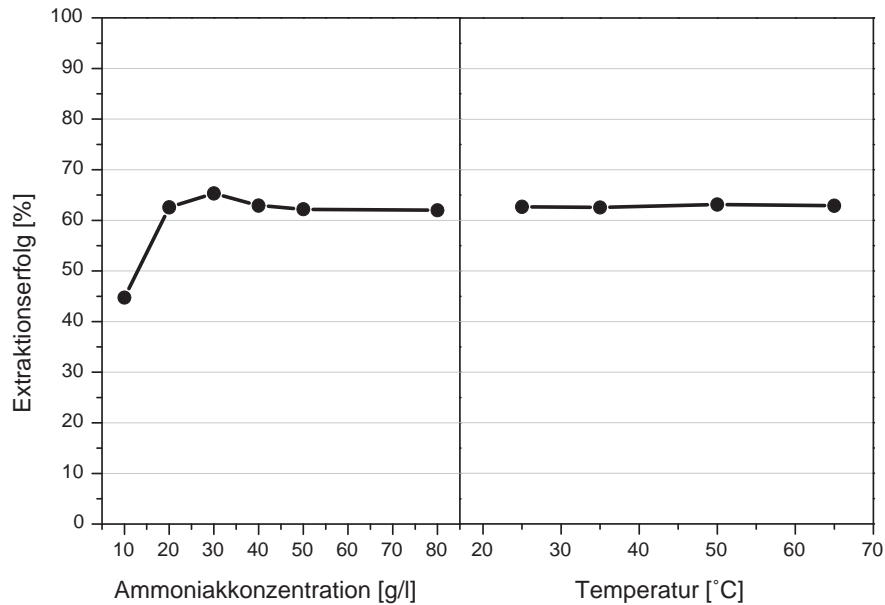


Abbildung 4.64: Rückextraktion mit wässriger Ammoniaklösung, Variation der Parameter Ammoniakkonzentration und Temperatur; 20 Minuten, $V_{wässrig} = V_{organisch}$, Extraktphasen aus Reaktivextraktionen der Modelllösung mit 61,25 g/l Itaconsäure und 19 g/l Glucose

zum Ammoniak untersucht werden.

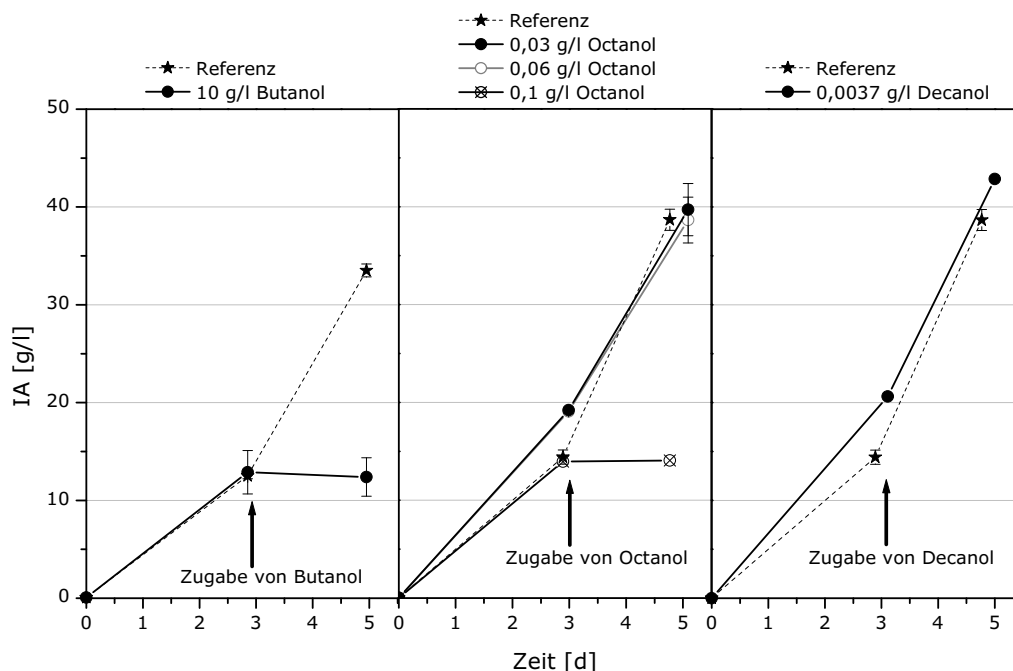
In einem ersten Versuch wurde das Lösungsmittel vor der Reextraktion mittels Destillation eingengt. Das 1-Butanol wurde nicht vollständig mit dem Rotationsverdampfer abgezogen, um ein vorzeitiges Ausfallen der IA zu verhindern. Anschließend wurde eine Reextraktion mit Wasser durchgeführt ($V_{organischePhase} = V_{wässrigePhase}$). Es konnten aber lediglich 0,8 g/l IA in der wässrigen Phase nachgewiesen werden. Durch eine weitere Reextraktion mit Zusatz einer wässrigen Ammoniaklösung (50 g/l Ammoniak) konnten 96 % der eingesetzten Itaconsäure in der wässrigen Phase nachgewiesen werden.

4.7.2.5 Untersuchung der Verträglichkeit des Extraktionsmittels

Bei dem Vorliegen einer Produkthemmung und einer Ansammlung inhibierender Substanzen während der Fermentation ist eine In-situ-Extraktion von Interesse. Bei dieser Methode wird während der Fermentation das Extraktionsmittel direkt mit der Fermentationsbrühe in Kontakt gebracht und z.B. das Produkt aus dieser entfernt, wodurch die Konzentration des inhibierenden Stoffes in der Fermentationsbrühe sinkt.

Für diese Abtrennung der Itaconsäure und einer Rückführung der extrahierten Fermentationsbrühe in den Reaktor wird die Verträglichkeit der verschiedenen Lösungsmittel auf das Wachstum und die Itaconsäure Produktion untersucht. Untersucht werden 1-Butanol (Löslichkeit in Wasser 77 g/kg bei 20 °C), 1-Octanol (Löslichkeit in Wasser 0,3 g/kg bei 20 °C) und Decanol (Löslichkeit in Wasser 0,037 g/kg bei 25 °C) (Abbildung 4.65).

Die Zugabe der Lösungsmittel erfolgte nach der Wachstumsphase und während der Pro-



Abbildungung 4.65: IA-Produktionsverläufe der Fermentation von *A. terreus* LU02b in 250 ml Erlenmeyerkolben (SK), Standardproduktionsmedium mit Zugabe verschiedener Konzentrationen von 1-Butanol, 1-Octanol und Decanol; 33 °C, Start pH 3,1 ungeregt, 120 Upm

duktionsphase. Nach der Zugabe von 1-Butanol, so dass die Endkonzentration in der Kultur 10 g/l betrug, stoppt der Pilz sofort mit der IA-Produktion. Zu einem wirtschaftlich nicht vertretbaren Verlust an Lösungsmittel würde somit hinzukommen, dass der Pilz mit einer sofortigen Einstellung der Itaconsäureproduktion auf die Präsenz von lediglich 1 % (w/w) Butanol im Medium reagiert, bei einer Wasserlöslichkeit von 7,7 %.

Bei der Zugabe von Octanol werden im Medium Konzentrationen von 0,03; 0,06 und 0,1 g/l erreicht. Die Referenzkultivierung hat nach ca. 3 Tagen 15 g/l und nach 5 Tagen 38 g/l IA produziert. Bis zum Zeitpunkt der Octanolzugabe, nach 3 Tagen, sind die Entwicklung der Biomasse und die Itaconsäurebildung in diesen Versuchskolben vergleichbar mit der Referenz. Octanolkonzentrationen bis 0,06 g/l scheinen keinen negativen Einfluss auf die Produktivität des Pilzes zu besitzen. Nach ca. 5 Tagen werden in den Kolben ebenfalls zwischen 37 und 40 g/l IA gebildet. 0,1 g/l Octanol hingegen scheint deutlich toxische Wirkung zu haben. Der Pilz stellt die Produktion der Itaconsäure nach dieser Octanolzugabe komplett ein. Die Löslichkeit von Octanol beträgt aber 0,3 g/l bei 20 °C. Dies bedeutet, dass die Rückführung extrahierten Mediums in den Reaktor begrenzt wird durch die Menge eingetragenen Octanols. Erreicht die Octanolkonzentration in der Fermentationsbrühe 0,1 g/l wird die IA-Produktion eingestellt.

Eine Konzentration von 0,0037 g/l Decanol wirkt sich nicht negativ auf die IA-Produktion aus. Die Löslichkeit von Decanol beträgt 0,037 g/l. In wie weit der Pilz durch höhere Decanolkonzentrationen beeinflusst wird muss in einem größeren Maßstab untersucht werden.

4.7.3 Kristallisation

Mit Hilfe von Vorversuchen wird bewertet, ob Itaconsäure durch Abkühlung zur Auskristallisation gebracht und somit in fester Form von der Kulturbrühe separiert werden kann. Bei der Kristallisation wurden 2 Versuche im Doppelansatz durchgeführt, bei denen abzentrifugierter Kulturüberstand bei zwei verschiedenen Temperaturen gelagert wurde. Ein Doppelansatz (Versuch UK1 und UK4) wurde bei 4 °C gelagert, sowie Ansatz UK2 und UK3 bei einer Temperatur von -20 °C für eine Zeitdauer von ca. 1-2 Wochen (Abbildung 4.66).



UK 1 (4 °C)
brauner Kristall



UK 2/3 (-20 °C)
weißes Pulver



UK 4 (4 °C)
helle Nadelkristalle

Abbildung 4.66: Kristallisation, Versuche UK1-UK4, Abbildungen der Feststoffe

Es wurden unterschiedliche Feststoffe an auskristallisierter Itaconsäure erhalten. Der erste Versuch zur Kristallisation (UK1, Schema der Kristallisation, Abbildung 3.10, Seite 50) ergab sehr dunkle Kristalle mit bräunlicher Färbung. Bei dem Doppelansatz UK2 und UK3 sind jeweils weiße Pulver erhalten worden. Bei UK4 entstanden kugelartige Formen bestehend aus hellen, nadelförmigen Kristallen. Eine Auswertung zur separierten Itaconsäure in Form von Kristallen oder Pulver erfolgte anhand der ermittelten Itaconsäure Konzentrationen (Abbildung 4.67) im ausgefallenen Kristall und dem Filtrat. Die Differenz zur eingesetzten IA-Konzentration (Nullprobe) bestimmt den Verlust. Die Itaconsäure wurde bei den verschiedenen Kristallisationen in Kristall- oder Pulverform quantitativ sehr unterschiedlich gebunden. Bei UK2 und UK3 (Säulen 2; 3) sind ca. 20 % der gesamt eingesetzten Itaconsäure im Kristall vorhanden, bei UK1 und UK4 (Säulen 1; 4) beträgt der Anteil ca. 50 % . Der Rest der Itaconsäure verbleibt in der Flüssigphase (Filtrat). Die Lagerung des Kulturüberstandes bei unterschiedlich tiefen Temperaturen bewirkt, dass Itaconsäure in verschiedenen Arten von Feststoffen auskristallisieren kann, es wird ein Kristall oder pulverartiger Feststoff erhalten.

Die Methode der Kristallisation von Itaconsäure bietet das Produkt nach Abkühlung des Kulturüberstandes in Form eines Feststoffes. Die Parameter Abkühlungsvorgang, Temperatur, Zeitdauer und erzielbare Reinheit des Kristallisats müssen optimiert werden, damit durch verschiedene Abkühl- und Einengprozesse des Kulturüberstandes das Produkt Itaconsäure in einem hohen Reinheitsgrad erhalten werden kann.

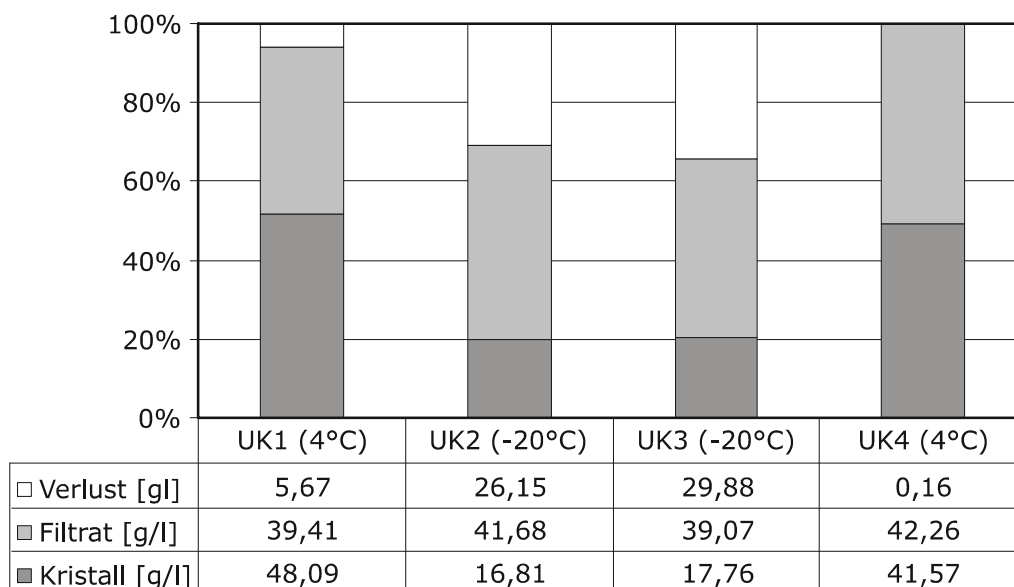


Abbildung 4.67: Kristallisation, Vergleich der Itaconsäurekonzentrationen im Feststoff, Filtrat und Verlust; Versuche UK1-4 (\equiv Säule 1-4)

4.7.4 Diskussion: Einsatz der verschiedenen Aufarbeitungsme-thoden

Die Aufarbeitung von Itaconsäure ist mittels Elektrodialyse, Reaktivextraktion und Kristallisation untersucht wurden. Das Produkt liegt am Ende der betrachteten Verfahren in unterschiedlichen Formen, zum Beispiel als wässrige Lösung oder Feststoff vor.

Die Elektrodialyse zeigt hinsichtlich der hohen erreichten Konversionsgrade sowie der Möglichkeit, ungeladene Moleküle wie Glucose selektiv von geladenen Komponenten wie Itaconsäure trennen zu können Vorteile. Nebenprodukte wie organische Säuren und somit andere geladene Moleküle werden nicht selektiv von der Itaconsäure getrennt. Diese Methode kann zur Aufkonzentrierung von Itaconsäure in eine wässrige Lösung eingesetzt werden. Allerdings können aufgrund der stark temperaturabhängigen Löslichkeit von Itaconsäure Probleme auftreten. Aufgrund von pH-Schwankungen kann es zu Ablagerungen (Scaling) an bzw. in den Membranen kommen, was eine Zerstörung dieser zur Folge hätte. Die Prozessführung bei der Elektrodialyse ist hingegen wenig aufwendig und kann im automatisierten Betrieb eingesetzt werden.

Unter Verwendung eines Gemisches aus Trioctylamin als Reaktivkomponente und 1-Butanol, 1-Octanol oder Decanol als Lösungsmittel können während nur zweiminütiger Mischzeit bei Raumtemperatur bis zu 95 % der Itaconsäure aus der wässrigen Phase extrahiert werden. Aus einer Kultivierungsbrühe erfolgt die Extraktion aber nicht selektiv. Die Nebenprodukte, andere organische Säuren, werden ebenfalls extrahiert, so dass sich der Extraktionserfolg für Itaconsäure auf ca. 85 % reduziert. Vorteilhaft ist hingegen, dass die Kulturbrühe mit Biomasse direkt eingesetzt werden kann. Somit bietet sich die

Reaktivextraktion als parallel- oder nachgeschalteter Verfahrensschritt zur Fermentation an.

Die Itaconsäure muss in einem zweiten Verfahrensschritt aus der organischen Phase in eine wässrige Phase Reextrahiert werden. Durch eine direkte Rückextraktion mittels einer wässrigen Ammoniaklösung (30 g/l Ammoniak) können temperatur- und zeitunabhängig lediglich ca. 65 % der Itaconsäure aus der Extraktphase zurückgewonnen werden. Durch vorherige Einengung des Octanols oder durch Austausch der Ammoniaklösung durch eine wässrige Lösung eines flüchtigen niedermolekularen tertiären Amins könnten höhere Extraktionserfolge bei der Rückextraktion der Itaconsäure erzielt werden (Poole and King, 1991; Jung et al., 2000). Erste eigene Versuche zeigten, dass nach dem Einengen der organischen Phase mit anschließender Rückextraktion mittels einer wässrigen Ammoniaklösung (50 g/l Ammoniak) 96 % der eingesetzten Itaconsäure in der wässrigen Phase nachgewiesen werden konnten.

Eine detaillierte Betrachtung der Reextraktion muss in weiteren Arbeiten durchgeführt werden.

Zur Zeit ist nicht bekannt aus welchem Grund keine höheren Itaconsäure Konzentrationen als 90 g/l gebildet werden. Im Hinblick auf eine ökonomische Itaconsäureproduktion könnte eine In-situ-Extraktion der gebildeten Itaconsäure interessant sein, vorausgesetzt der Pilz produziert während eines Fermentationszyklus höhere absolute Mengen an Itaconsäure. Bei dieser Extraktion würde zellfreie Kulturbrühe aus dem Fermenter der Flüssig/flüssig Extraktion zugeführt werden und das extrahierte Medium würde anschließend in den Reaktor zurückgeführt werden. Diese Rückführung wird allerdings begrenzt durch die Menge an Lösungsmittel welche in die wässrige Phase übergeht und somit dem Reaktorinhalt zugeführt würde. Butanol scheidet für diese Verfahrensweise aus, da die Wasserlöslichkeit mit 77 g/l zu hoch ist. Zu dem unwirtschaftlichen Verlust von Lösungsmittel kommt hinzu, dass der Pilz bereits bei Konzentrationen von 10 g/l Butanol die Itaconsäure Produktion vollständig einstellt. Bei den längerkettigen Lösungsmitteln nimmt die Wasserlöslichkeit ab, aber das Extraktionsvermögen bleibt nahezu konstant. Konzentrationen bis 0,06 g/l Octanol beeinträchtigen den Pilz in der Itaconsäure Produktion nicht. Bei 0,1 g/l Octanol reagiert der Pilz jedoch mit einer Reduzierung der Produktivität. Um dennoch eine In-situ-Extraktion mit Medienrückführung zu verwirklichen, bedarf es daher eines längerkettigen Lösungsmittels oder die abgereicherte Fermentationsbrühe muss bevor sie in den Reaktor zurück geleitet wird von dem Extraktionsmittel gereinigt werden. Bei der kontinuierlichen Citronensäureherstellung wurde dies mittels eines Aktivkohlefilters verwirklicht (Wieczorek and Brauer, 1998).

Die in dieser Arbeit durchgeführten ersten Untersuchungen zur Reaktivextraktion zeigen, dass diese Methode prinzipiell zur Aufarbeitung von IA geeignet ist. Um aber eine Aufarbeitungsmethode mittels Extraktion zu entwickeln bedarf es allerdings weiteren umfangreichen Untersuchungen.

Durch die Kristallisation wird das Produkt Itaconsäure in fester kristalliner Form direkt aus der Kulturbrühe gewonnen. Einflüsse wie die Temperatur und die Durchführung des Abkühlungsprozesses bestimmen die Gestalt und die Reinheit des Feststoffes. Es bedarf weitergehenden Studien um ein optimales Kristallisationsverfahren, bestehend aus verschiedenen Eineng- und Abkühlungsschritten, durchzuführen um eine möglichst hohe

Qualität an Itaconsäure zu erhalten.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, die hier untersuchten Aufarbeitungsmethoden zu kombinieren um einen hohen Konversionsgrad der Itaconsäure sowie die geforderte Reinheit zu erhalten.

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

Während dieser Arbeit konnten diverse Arbeiten, wie die Handhabung des Pilzes während der Kultivierung, die Optimierung des Phosphatgehaltes, Untersuchungen zur Sauerstoffversorgung, der Einfluss verschiedener Medienkomponenten sowie die detaillierte Betrachtungen der Nebenproduktbildung erheblich zum Verständnis und vor allem zur Effizienzsteigerung der fermentativen Itaconsäureherstellung mittels *Aspergillus terreus* beitragen.

Es wurden Kultivierungsbedingungen geschaffen, unter denen die Itaconsäureherstellung reproduzierbar ist. Ausgehend von einer Prozessoptimierung mit dem Pilz *Aspergillus terreus* LU02b im 1 l Maßstab (83 g/l nach 8 Tagen, $P_{max} = 1,29$ g/(lh), molare Ausbeute von 80 mol%), fand eine erfolgreiche Maßstabsvergrößerung zu 10 l statt. Nach 4 Tagen Kultivierung und einer bis dahin erreichten Konzentration von ca. 60 g/l Itaconsäure sinkt aus bisher ungeklärten Gründen die Produktivität. Innerhalb von 7 Tagen werden insgesamt 86,2 g/l Itaconsäure gebildet, mit einer Ausbeute von 86 mol%.

Die Itaconsäureendkonzentration konnte auf ca. 90 g/l IA gesteigert werden, bei einer gleichzeitigen Verkürzung der Kultivierungsdauer auf 7 Tagen. Verschiedene Sachverhalte, wie z.B. die Produktivitätsabnahme nach 2,5 und 4 Tagen, das Anhäufen der cis- und trans-Aconitsäure, keine höheren Itaconsäurekonzentrationen als 90 g/l konnten innerhalb dieser Forschungsarbeit nicht geklärt werden.

Zur Aufklärung der Produktivitätseinbußen nach 4 Tagen wäre eine weitergehende Studie zur Wirkung verschiedener Eisengehalte und Cysteinkonzentrationen nötig. Durch Zellaufschluss könnten die tatsächlich vorliegenden Konzentrationen von cis- und trans-Aconitsäure sowie die der Spurenelemente bestimmt werden. Zur Verkürzung der Wachstumsphase, bzw. der Zeit bis zum Produktionsbeginn, könnten höhere pH-Werte und niedrigere Gelöstsauerstoffpartialdrücke während der Wachstumsphase sowie eine Optimierung der Sporenanfangskonzentration beitragen.

Die Itaconsäureherstellung ist unter den beschriebenen Bedingungen reproduzierbar und kontrolliert durchführbar. Durch die verschiedensten Variationen der Medienbestandteile und physikalischen Parametern, wie Temperatur und Sauerstoffeinfluss, konnten keine Endkonzentrationen über 90 g/l Itaconsäure erreicht werden. Mit einem Screening nach neuen Itaconsäureproduzenten und Mutation, bzw. Adaptation an hohe Itaconsäurekonzentrationen könnten unter den in dieser Arbeit erreichten, standardisierten Kultivierungsbedingungen leistungsfähigere Mikroorganismen gefunden werden.

Unter Verwendung von Neben-bzw. Abfallprodukten konnte keine bessere Itaconsäureproduktion erreicht werden als mit Glucose und Saccharose. Der Pilz kann Xylose und Glycerin als Kohlenstoffquelle nutzen. Der Pilz reagiert stark auf Verunreinigungen und Verschiebungen bestimmter Nährstoffverhältnisse, daher ist eine Analyse der Neben-bzw. Abfallprodukte, z.B. von Rohglycerinen, mit eventuell anschließender Aufreinigung notwendig um geringe Ausbeuten zu vermeiden.

Die ersten Produkt-Extraktionsexperimente dieser Arbeit liefern Ergebnisse über das kombinierte Extraktionsmittelsystem 1-Butanol, 1-Octanol und Decanol als Lösungsmittel und der Reaktivkomponente Trioctylamin. Es konnten bis zu 95 % der Itaconsäure aus der wässrigen Phase einer Modelllösung extrahiert werden. Aus einer Kultivierungsbrühe erfolgt die Extraktion nicht selektiv. Die Nebenprodukte, andere organische Säuren, werden ebenfalls extrahiert, so dass sich der Extraktionserfolg für Itaconsäure auf ca. 85 % reduziert. Vorteilhaft ist, dass die Kulturbrühe mit Biomasse direkt eingesetzt werden kann. Somit bietet sich die Reaktivextraktion als parallel- oder nachgeschalteter Verfahrensschritt zur Fermentation an.

Bei Vorliegen einer Produkthemmung und/oder sich während der Fermentation ansammelnder Hemmstoffe ist der Einsatz eines In-situ-Extraktionsverfahren sinnvoll. Eine In-situ-Extraktion mit Butanol scheidet aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit und der Unverträglichkeit im Bezug auf die Itaconsäureproduktion der gelösten Butanolen in der wässrigen Phase aus. Bei einer Octanolkonzentration in der Fermentationsbrühe von 0,1 g/l wird die Itaconsäure Produktion eingestellt. Die Wasserlöslichkeit von Octanol beträgt bei 20 °C allerdings 0,3 g/l.

Diese ersten Untersuchungen zeigen, dass auf diesem Gebiet, sowohl in der Reaktivextraktion als auch in der Reextraktion, weitere, sehr umfangreiche Untersuchungen notwendig sind. Es muss nach neuen geeigneten Lösungsmitteln zur IA-Extraktion gesucht werden, die eine geringe Wasserlöslichkeit zeigen und nicht toxisch auf die Zelle wirken. Weiterhin muss eine effektive Methode zur Reextraktion entwickelt werden.

Anhang A

Analysenwerte der Neben- bzw. Abfallprodukte

A.1 Analysenwerte des Kartoffelrestfruchtwasser- Konzentrates (Fa. Südzucker AG)

Tabelle A.1: Produktdatenblatt Kartoffelrestfruchtwasser- Konzentrat 24.121 (KRFW); erstellt: 28.08.2002; Analysenwerte/Nährstoffgehalt

Trockensubstanz	600,0 g
Eiweißgehalt	180,0 g
Gesamt-Stickstoff (N)	33,1 g
Nitrat-Stickstoff (NO ₃ -N)	1,0 g
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N)	5,5 g
Organischer Stickstoff (N org.)	28,4 g
Phosphor (P ₂ O ₅)	13,2 g
Kalium (K ₂ O)	84,1 g
Kalk (CaO)	2,0 g
Magnesium (MgO)	6,6 g
Natrium (Na ₂ O)	3,4 g

Die angegebenen Werte sind Durchschnittswerte und unterliegen natürlichen, rohstoffbedingten Schwankungen. Alle Angaben erfolgen in Gramm je 1 kg Produkt (Durchschnitt von 3 Kampagnen).

A.2 Analysenwerte des Maisquellwasser (Fa. Südzucker AG)

Tabelle A.2: Analysenwerte/Nährstoffgehalt des Maisquellwasser, Fa. Südzucker AG

50 % Trockensubstanz, davon:	[g/kg]
27 % Stickstoff	135
25 % Protein	125
15 % Asche	75
5 % Fett	25
5 % Glucose	25
5,5 % Stärke	28
11 % Kohlenhydrate	55
6 % Lactat	30

Anhang B

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Durch seine stete Diskussionsbereitschaft sowie seinen vielfältigen Anregungen trug er wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. Thomas Willke danke ich für die enge und effektive Zusammenarbeit, für die zahlreichen ergiebigen Diskussionen sowie für die Unterstützung im Bereich der Analytik. Mit vielfältigen Anregungen und Ideen hat er mich während dieser Arbeit unterstützt.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Agrartechnologie des Johann Heinrich von Thünen-Instituts Braunschweig für die gute Einarbeitung, vielseitigen Hilfestellungen, für die Diskussion der Ergebnisse, für die Motivation während der gesamten Arbeit und für das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Ing (FH) Susanne Hirschmann, Frau Dipl.-Biotechnol. Claudia Wilkens, Frau Dipl.-Biologin Tanja Hartwich, Herrn Dipl.-Biotechnol. Claus Decker, Frau Dipl.-Ing., Wibke Hußmann und Frau Dr. Milada Schubert.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Linda Witzke und Frau Yvonne Gallenmüller für ihre wertvolle Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. und der Südzucker AG.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Alexander für seine Unterstützung und Geduld während der gesamten Arbeit.

Literaturverzeichnis

- Adler, I. and A. Flechter (1983). Characterization of bioreactors with biological test systems. *Chemie Ingenieur Technik* 55(4), 322–323.
- Atkins, P. W. (1984). *Physikal Chemistry*. Oxford: Oxford University Press.
- Batti, M. and L. B. Schweiger (1963). Process for the production of itaconic acid. United States Patent Office 3 078 217.
- Baup, S. (1837). Über eine neue Pyrogen- Citronensäure, und über Benennung der Pyrogen Säure überhaupt. *Annales de Chimie et de Physique* 19, 29–38.
- Bentley, R. and C. P. Thiessen (1957). Biosynthesis of itaconic acid in aspergillus-terreus .3. the properties and reaction mechanism of cis-aconitic acid decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry* 226(2), 703–720.
- Bonnarme, P., B. Gillet, A. M. Sepulchre, C. Role, J. C. Beloeil, and C. Ducrocq (1995). Itaconate biosynthesis in aspergillus-terreus. *Journal of Bacteriology* 177(12), 3573–3578.
- Bressler, E. and S. Braun (2000). Conversion of citric acid to itaconic acid in a novel liquid membrane bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75(1), 66–72.
- Brown, N. M., M. C. Kennedy, W. E. Antholine, R. S. Eisenstein, and W. E. Walden (2002). Detection of a [3fe-4s] cluster intermediate of cytosolic aconitase in yeast expressing iron regulatory protein 1 - insights into the mechanism of fe-s cluster cycling. *Journal of Biological Chemistry* 277(9), 7246–7254.
- Bruchmann, E. (1963). *Über Aconitat- Hydratase ihre chromatographische Reinigung und einige Hemmstoffe des Enzyms*. Habilitationsschrift, Technische Biochemie, Technische Universität Berlin.
- Calam, C. T. (1939). Studies in the biochemistry of microorganisms. xxiii. itaconic acid, a metabolic product of aspergillus terreus thom. *Biochemical Journal* 33, 1488–1495.
- Chmiel, H. (1991). *Bioprozetechnik 1*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Cocker, R. and R. N. Greenshields (1977). Fermenter cultivation of aspergillus. In P. J. A. Smith J.E. (Ed.), *Genetics and Physiology of Aspergillus*,, pp. 361–389. Academic Press, London.

- Cowan, D. and J. Brown (1959). Effect of turbulence on limiting current in electrodialysis cells. *Industrial and Engineering Chemistry* 51(12), 1445–1447.
- Crueger, W. and A. Crueger (1989). *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie* (3 ed.). München; Wien; Oldenbourg: R. Oldenbourg Verlag GmbH.
- Deckwer, W., R. Luttmann, H. Reng, and S. Yonsel (1987). *Bioreaktoren: Ein Leitfaden für Anwender*. Number 4. Braunschweig: GBF- Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH.
- Dwiarti, L., K. Yamane, H. Yamatani, P. Kahar, and M. Okabe (2002). Purification and characterization of cis-aconitic acid decarboxylase from *aspergillus terreus* tn484-m1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94(1), 29–33.
- Eimhjellen, K. E. and H. Larsen (1955). Mechanism of itaconic acid formation by *aspergillus-terreus* .2. effect of substrates and inhibitors. *Biochemical Journal* 60(1-4), 139–147.
- El-Enshasy, H. A. (1998). *Optimization of Glucose Oxidase production and excretion by recombinant Aspergillus niger*. Thesis/dissertation, Braunschweig, Technische Universität Braunschweig, Gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät.
- GESTIS (2008). GESTIS-Stoffdatenbank des BGIA, abgerufen am 10.01.2008
<http://www.hvbg.de/d/bia/gestis/stoffdb/index.html>.
- Gibbs, P. A., R. J. Seviour, and F. Schmid (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology* 20(1), 17–48.
- Glusker, J. (1971). Aconitase. In P. Boyer (Ed.), *The Enzymes* (3 ed.), Volume 5, chapter 14, pp. 413–439. Academic Press, New York.
- Gyamerah, M. (1995a). Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44(3-4), 356–361.
- Gyamerah, M. H. (1995b). Oxygen requirement and energy relations of itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus* NRRL 1960. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44(1-2), 20–26.
- Hirth, J. (2003). *Verfahrensentwicklung zur Synthese von 5- Hydroxymethylfurfural und Kohlenhydratcarbonsäuren auf Basis nachwachsender Rohstoffe*. Thesis/dissertation, Fachbereich Chemie; Universität Darmstadt.
- Hirth, J., M. Bicker, and H. Vogel (2002). Isolation of carbohydrate carboxylic acids from aqueous solution by reactive extraction. *Chemie Ingenieur Technik* 74(3), 345–350.
- Jahnz, U., T. Willke, and K. D. Vorlop (2003). Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie 8. Symposium 2003. In e.V. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (Ed.), *Schriftenreihe „Nachwachsende Rohstoffe“*, Band 22, pp. 523–529. Landwirtschaftsverlag GmbH.

- Jaklitsch, W. M., C. P. Kubicek, and M. C. Scrutton (1991). The subcellular organization of itaconate biosynthesis in *aspergillus-terreus*. *Journal of General Microbiology* 137, 533–539.
- Jung, M., B. Schierbaum, and H. Vogel (2000). Extraction of carboxylic acids from aqueous solutions with the extractant system alcohol/tri-n-alkylamines. *Chemical Engineering and Technology* 23(1), 70–74.
- Karlson, P., D. Doenecke, and J. Koolman (1994). *Biochemie* (14 ed.). New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Kautola, H., N. Vassilev, and Y. Y. Linko (1989). Itaconic acid production by immobilized *aspergillus-terreus* on sucrose medium. *Biotechnology Letters* 11(5), 313–318.
- Kennedy, M. C., L. MendemueLLer, G. A. Blondin, and H. Beinert (1992). Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef-liver and its relationship to the iron-responsive element binding-protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(24), 11730–11734.
- Kinoshita, K. (1932). Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz, *aspergillus itaconicus*;. *Acta Phytochimica* 5, 271–287.
- Kobayashi, T. (1971). Process for recovering itaconic acid and salts thereof from fermented broth. JP-Patent 3 621 053.
- Kobayashi, T., I. Nakamura, and M. Nakagawa (1972). Process design for itaconic acid fermentation. *Proc IV IFS: Ferm Technol today*, 215–221.
- Kobayashi, T., I. Nakamura, and M. Nakagawa (1973). Itaconic acid production. JP-Patent 48 092 584.
- Kobayashi, T., I. Nakamura, and M. Nakagawa (1980). Itaconic acid production. JP-Patent 51 028 711.
- Kreitmeier, P. (2001). Umkristallisation; Tutorial zum Organischen Praktikum als Hypertextsystem. In *Einführung in die apparativen Methoden der organischen Chemie*, Kapitel 5. Uni Regensburg.
- Liedtke, M. P. and E. Ohmann (1969). Properties and regulation of a phosphatase from *euglena gracilis* and its preparation and inactivation. *European Journal of Biochemistry* 10(3), 539.
- Ling, L., H. Leow, and M. Sarmidi (2002). Citric acid concentration by electrodialysis: ion and water transport modelling. *Journal of Membrane Science* 199(1-2), 59–67.
- Lockwood, L. B. (1975). Production of organic acids by fermentation. In H. Peppler and D. Perlman (Eds.), *Microbial Technology* (2 ed.), Volume 1, chapter 11, pp. 356–386. Academic Press.

- Lockwood, L. B. and G. E. N. Nelson (1946). Some factors affecting the production of itaconic acid by *aspergillus-terreus* in agitated cultures. *Archives of Biochemistry* 10(3), 365–374.
- Lockwood, L. B. and M. D. Reeves (1945). Some factors affecting the production of itaconic acid by *aspergillus terreus*. *Archives of Biochemistry* 6(3), 455–469.
- Merck (2003). Darmstadt(hrsg.): Chemikalien reagenzien 2003. Willmy, Print/Media GmbH.
- Mersmann, A. (2005). *Thermische Verfahrenstechnik: Grundlagen und Methoden*. Springer - Verlag.
- Moresi, M. and F. Sappino (2000). Electrodialytic recovery of some fermentation products from model solutions: techno-economic feasibility study. *Journal of Membrane Science* 164(1-2), 129–140.
- Novalic, S., F. Jagschits, J. Okwor, and K. D. Kulbe (1995). Behaviour of citric acid during electrodialysis. *Journal of Membrane Science* 108(3), 201–205.
- Nubel, R. C. and R. Ratajak (1962). Process for producing itaconic acid. United States Patent Office 3 044 941.
- OECD (2008). OECD-Datenblatt, abgerufen am 10.01.2008
http://www.eeaa.gov.eg/cmuic/cmuic_pdfs/generalpub/Butanedioic%20acid,%20methylen.htm.
- Okabe, M., N. Ohta, and Y. S. Park (1993). Itaconic acid production in an airlift bioreactor using a modified draft tube. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 76(2), 117–122.
- Omar, S. H., S. Honecker, and H. J. Rehm (1992). A comparative-study on the formation of citric-acid and polyols and on morphological-changes of 3 strains of free and immobilized *aspergillus-niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36(4), 518–524.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22(3), 189–259.
- Park, Y. S., N. Ohta, and M. Okabe (1993). Effect of dissolved-oxygen concentration and impeller tip speed on itaconic acid production by *aspergillus-terreus*. *Biotechnology Letters* 15(6), 583–586.
- Pfizer (1972). *Itaconsäure*. Pfizer GmbH Karlsruhe.
- Poole, L. J. and C. J. King (1991). Regeneration of carboxylic-acid amine extracts by back-extraction with an aqueous-solution of a volatile amine. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 30(5), 923–929.
- Prosser, J. (1994). Kinetics of filamentous growth and branching. In A. Neil and G. und Geoffrey M.Gadd. (Eds.), *The growing Fungus*. Chapman and Hall.

- Puttemans, M., L. Dryon, and D. L. Massart (1984a). Extraction of organic-acids by ion-pair formation with tri-n-octylamine .1. extraction rate and influence of ph and ionic-strength. *Analytica Chimica Acta* 161(JUL), 221–229.
- Puttemans, M., L. Dryon, and D. L. Massart (1984b). Extraction of organic-acids by ion-pair formation with tri-n-octylamine .2. back-extraction. *Analytica Chimica Acta* 161(JUL), 381–386.
- Rapp, H. (1995). *Die Elektrodialyse mit bipolaren Membranen - Theorie und Anwendung*. Thesis/dissertation, Institut für Chemische Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart.
- Regev-Rudzki, N., S. Karniely, N. N. B. Haim, and O. Pines (2005). Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: Seeing small amounts is believing. *Molecular Biology of the Cell* 16(9), 4163–4171.
- Rhone-Poulenc, C. (1994). Procédé de Production par Fermentation d'Acide itaconique. Französisches Patent 2 702 492.
- Roehr, M. (1998). A century of citric acid fermentation and research. *Food Technology and Biotechnology* 36(3), 163–171.
- Roehr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek (1992). Industrial acids and other small molecules. In M. Bennet, J.W.; Klich (Ed.), *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*, Kapitel 5, pp. 91–131.
- Roehr, M., C. P. Kubicek, and J. Kominek (1996). Products of primary metabolism. In H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. J. W. Stadler (Eds.), *Biotechnology* (2 ed.), Volume 6, pp. 307–345. VCH-Verlag, Weinheim, New York, Cambridge, Tokyo.
- Rüdiger, C. (2000). *Synthesen und Untersuchungen zum Polymerisationsverhalten von Itaconsäurederivaten*. Thesis/dissertation, Wuppertal, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal, Fachbereich Chemie.
- Schlegel, H. G. (1985). Die Pilze (Fungi=Mycota). In *Allgemeine Mikrobiologie*, Kapitel 5, pp. 162–167. Georg Thieme Verlag.
- Schomburg, D. and I. Schomburg (2002). *Springer handbook of enzymes* (2 ed.), Volume 3. Berlin: Springer.
- Sittig, W. and H. Heine (1977). Industrial bio-reactors. *Chemie Ingenieur Technik* 49(8), 595–678.
- Storhas, W. (2003). *Bioverfahrensentwicklung* (1 ed.). Weinheim: Wiley, VCH.
- Strathmann, H. and H. Chmiel (1984). Electrodialysis - a membrane process with considerable scope. *Chemie Ingenieur Technik* 56(3), 214–220.

- Tamada, J. A. and C. J. King (1990). Extraction of carboxylic-acids with amine extractants 2 chemical interactions and interpretation of data. *Industrial And Engineering Chemistry Research* 29(7), 1327–1333.
- Tate, B. E. (1981). Itaconic acid and derivatives. *Grayson M. Eckroth E (eds) Kirk-Othmer Encycl Chem Technol* 3, 865–873.
- Träger, M., G. N. Qazi, R. Buse, and U. Onken (1992). Influence of constant and oscillating dissolved-oxygen concentration on aspergillus-niger. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74(5), 282–287.
- v.Fries, H. (1966). Verfahren zur fermentativen Herstellung von Itaconsäure durch submers-aerobe Schimmelpilzgärung. Deutsches Bundespatent 1 290 430.
- Welter, K. (2000). *Biotechnische Produktion von Itaconsäure aus nachwachsenden Rohstoffen mit immobilisierten Zellen*. Thesis/dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät der Technischen Universität Braunschweig.
- Wieczorek, S. and H. Brauer (1998). Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery part 2: Product recovery and recirculation of the fermentation broth. *Bioprocess Engineering* 18(2), 75–77.
- Willke, T. and K. D. Vorlop (2001). Biotechnological production of itaconic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(3-4), 289–295.
- Winskill, N. (1983). Tricarboxylic-acid cycle activity in relation to itaconic acid biosynthesis by aspergillus-terreus. *Journal of General Microbiology* 129(SEP), 2877–2883.
- Xu, T. (2002). Electrodialysis processes with bipolar membranes (edbm) in environmental protection - a review. *Resources Conservation and Recycling* 37(1), 1–22.